รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี
Research and Development on Biological Control of Agricultural Pests

สาทิพย์ มาลี
Satip Malee

ปี พ.ศ. 2558

รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี
Research and Development on Biological Control of Agricultural Pests

สาทิพย์ มาลี
Satip Malee

ปี พ.ศ. 2558

คำปรารภ

โครงการวิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี เป็นโครงการวิจัยระยะห้าปี ดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึงเดือนกันยายน 2558 ทำการศึกษาทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการ และ/หรือสภาพไร่นา เป็นโครงการวิจัยที่ดำเนินงานเพื่อสนับสนุนการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี โดยมีแนวความคิดที่จะใช้สิ่งที่มีประโยชน์ในธรรมชาติมาช่วยแก้ปัญหาการระบาดของศัตรูพืช กล่าวคือ นำเอาศัตรูธรรมชาติที่สำคัญได้แก่ ตัวเบียน (parasites) ตัวห้ำ (predators) และเชื้อโรค (pathogens) มาควบคุมศัตรูพืช โดยรักษาระดับความหนาแน่นของประชากรของศัตรูพืชชนิดให้อยู่ต่ำกว่าระดับที่จะทำให้อยู่ต่ำกว่าระดับที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต เป็นการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร ลดผลกระทบจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างไม่ถูกต้อง โดยโครงการนี้มีการศึกษาครอบคลุมทั้งการคัดเลือก การผลิตขยายให้มีปริมาณมาก และวิธีการนำไปใช้

จึงหวังเป็นอย่างยิ่งว่า ผลการทดลองที่ได้รับจากโครงการวิจัยที่เสร็จสมบูรณ์นี้แล้ว จะเป็นประโยชน์กับเกษตรกร นักวิชาการ เอกชน หรือผู้ที่เกี่ยวข้องทั้งหลายนำไปเป็นแนวทางปฏิบัติเพื่อแก้ปัญหาศัตรูพืชทางการเกษตร รวมทั้งนำผลการศึกษาวิจัยนี้ไปต่อยอดในการศึกษาด้านอื่น ๆ ต่อไป

สาทิพย์ มาลี
นักกีฏวิทยาชำนาญการ
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
หัวหน้าโครงการ

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
ผู้วิจัย	2
บทนำ	4
บทคัดย่อ	
กิจกรรมที่ 1 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช	7
กิจกรรมที่ 2 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช	65
กิจกรรมที่ 3 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช	193
กิจกรรมที่ 4 การควบคุมสัตว์ศัตรูพืช และวัชพืชโดยชีววิธี	413
กิจกรรมที่ 5 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก	475
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	514
บรรณานุกรม	515
ภาคผนวก	547

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และคณะกรรมการบริหารงานวิจัย สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ได้ช่วยกันพิจารณาแก้ไข และให้คำแนะนำในการดำเนินการโครงการวิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี อีกทั้งได้รับความร่วมมือ สนับสนุนและการอำนวยความสะดวกจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และหน่วยงานต่าง ๆ ของกรมวิชาการเกษตรทั้งส่วนกลางและส่วนภูมิภาค

วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี
Research and Development on Biological Control of Agricultural Pests

ผู้วิจัย

สาทิพย์ มาลี[1/] รจนา ไวยเจริญ[1/] ประภัสสร เชยคำแหง[1/] รัตนา นชะพงษ์[1/]
สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต[1/] สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี[1/] อิศเรส เทียมทัด[1/] วิไลวรรณ เวชยันต์[1/]
ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์[1/] พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์[1/] มานิตา คงชื่นสิน[1/]
ดาราพร รินทะรักษ์[1/] ปราสาททอง พรหมเกิด[1/] วิชาญ วรรธนะไกวัล[1/] ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์[1/]
ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] บุษราคัม อุดมศักดิ์[1/] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1/] สุรีย์พร บัวอาจ[1/]
พีระวรรณ พัฒนวิภาส[1/] ธารทิพย ภาสบุตร[1/] อภิรัชต์ สมฤทธิ์[1/] ทัศนาพร ทัศคร[1/]
ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/] รุ่งนภา ทองเครื่ง[1/] ไตรเดช ข่ายทอง[1/] ธิติยา สารพัฒน์[1/]
ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี[1/] พจนา ตระกูลสุขรัตน์[1/] รุ่งนภา คงสุวรรณ[1/] เสริมศิริ คงแสงดาว[1/]
ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย[1/] สุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง[2/]

[1/]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

คำสำคัญ

คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ศัตรูธรรมชาติ การผลิต แตนเบียน แมลงห้ำ ไรตัวห้ำ เพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง แมลงช้างปีกใส แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว ชีวภัณฑ์ แบคทีเรีย บีที ไวรัสโรคแมลง ไวรัส NPV เชื้อราเขียวมัสคาดีน ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โปรโตซัว เหยื่อโปรโตซัวสูตรใหม่ อาหารเทียม จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ การควบคุมคุณภาพ เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย โรคเน่าเละ แบคทีเรียปฏิปักษ์ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โรคยางไหล, เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โรคใบจุด โรคแอนแทรคโนสพริก โรคโคนเน่า เชื้อราเอนโดไฟท์ ไส้เดือนฝอยรากปม เชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอย โรคเน่าดำ

Biological control, natural enemies, mass rearing, parasitoids, predators, pest mites, predator, cassava mealybug, Green lacewings, coconut hispine beetle parasitoid, bio-pesticides, bacteria, *Bacillus thruingiensis*, entomopathoginic virus, Nuclearpolyhydrosis virus, green muscardine fungus, bio-agents, entomopathogenic nematodes, Protozoa, new Protozoa bait formulation, artificial diet, antagonist, quality control, aphids, thrips, *Spodoptera litura*, *Spodoptera exigua, Helicoverpa armigera Ralstonia solanacearum,* Bacterial wilt disease, orchids soft rot, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* , *Erwinia chrysanthemi*, antagonistic bacteria, *Fusarium solani*, *Didymella bryoniae*, cucurbits, Gummy Stem Blight, ,antoagonist bacteria, *Trichoderma harzianum*, Alternaria, *Oudermansiella*, *Collectotrichum*, biocontrol agent, endophytic fungi, *Slerotium rolfsii*, stem rot, Nematophagous fungi,root-knot nematode, *Bacillus* **,** *Phytophthora parasitica*

บทนำ (Introduction)

"การควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี" เป็นทางเลือกที่สำคัญในการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรในการจัดการศัตรูพืช (IPM) มีองค์ประกอบที่สำคัญ ประกอบด้วยการการใช้ประโยชน์จากศัตรูธรรมชาติ ได้แก่ ตัวเบียน ตัวห้ำ จุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ปัจจุบันมีการนำการควบคุมศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมีเข้ามารวมเป็นการควบคุมโดยชีววิธีแบบร่วมสมัย การผลิตขยาย การเพาะเลี้ยงศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมากและนำออกปล่อย เพื่อให้เกิดผลในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางการเกษตร หากประสบผลสำเร็จ จะให้ผลในการควบคุมศัตรูพืชในระยะยาว เกิดการควบคุมที่ยั่งยืน ในบางครั้งสามารถนำไปใช้ร่วมกันกับสารเคมีอย่างเหมาะสม จะสามารถควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ การจัดการเพื่อนำศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ไปใช้ประโยชน์ จัดเป็นการพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ การวิจัยและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จากศัตรูธรรมชาติชนิดต่าง ๆ ในเวลาที่เหมาะสม จะสามารถเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ไม่มีพิษตกค้างในผลผลิต และไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม หากดำเนินการตามวิธีการที่กำหนดไว้จะสามารถนำมาใช้ลด หรือทดแทนการใช้สารเคมีที่ต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ รวมทั้งเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับทรัพยากรธรรมชาติด้วย

การผลิตขยายและการนำศัตรูธรรมชาติชนิดต่าง ๆ มาใช้ประโยชน์เป็นงานวิจัยและพัฒนาที่ต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากการศึกษาศัตรูธรรมชาติทั้งที่มีอยู่ในประเทศ หรือชนิดใหม่ๆ ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ต้องวิจัยพัฒนาขบวนการที่เหมาะสมในการผลิตและการนำไปใช้ประโยชน์ในสภาพไร่ หากพบว่ามีศักยภาพที่สามารถนำมาผลิตขยายให้ได้ปริมาณมาก มีรูปแบบการผลิตที่เป็นระบบที่สามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่อง จะต้องมีการศึกษาประสิทธิภาพ อัตราการใช้ เวลาที่เหมาะสม ตลอดจนมีรูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่สามารถรักษาคุณภาพชีวินทรีย์ที่ผลิตได้ และนำไปใช้ได้สะดวก และ เป็นงานวิจัยที่ต้องเร่งวิจัยอย่างครบวงจรเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ชีวินทรีย์ที่ดี มีคุณภาพ สามารถนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชได้ดี

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีในการนำศัตรูธรรมชาติมาใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้แก่ แมลงหวี่ขาว เพลี้ยแป้ง แมลงดำหนามมะพร้าว เพลี้ยไฟ ไรแดง หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย และวิจัยพัฒนาการผลิตและใช้เชื้อปฏิปักษ์ ได้แก่ การใช้แบคทีเรียควบคุมโรคพืช และการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช นอกจากนั้นยังศึกษาวิจัยและทดสอบประสิทธิภาพของ แมลงศัตรูธรรมชาติ พืชแข่งขัน และฝอยทองในการควบคุมวัชพืช การทดสอบและคัดเลือกศัตรูธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช การวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก และการนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร นอกจากนั้นยังศึกษาวิจัยพัฒนาการผลิตชีวภัณฑ์ (Bio-agents) ที่มีประสิทธิทธิภาพ สามารถถ่ายทอดให้เกษตรกร กลุ่มเกษตรกร หน่วยงานต่างๆ และเอกชนนำไปผลิตและใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี

บทคัดย่อโครงการ

โครงการวิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี ระยะเวลาดำเนินการ 5 ปี ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2558 มีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีในการนำศัตรูธรรมชาติมาใช้ควบคุมศัตรูพืช เพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร ทำการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และในสภาพแปลงของเกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 61 การทดลอง ประกอบด้วย 5 กิจกรรม กิจกรรมที่ 1 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช จำนวน 7 การทดลอง ทำการศึกษาแมลงศัตรูธรรมชาติเพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว ศึกษาศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำและผีเสื้อตัวห้ำ พัฒนาการผลิตขยายมวนเพชฌฆาต และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อแมลงช้างปีกใส กิจกรรมที่ 2 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช จำนวน 20 การทดลอง ประกอบด้วย การศึกษาด้านไวรัส NPV ได้แก่ ศึกษาการผลิตไวรัส NPV โดยเซลล์เพาะเลี้ยง พัฒนาสูตรไวรัส NPV การเก็บรักษาและการนำไปใช้ การศึกษาด้าน BT ได้แก่ การคัดเลือก BT ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง การผลิตขยาย BT ผลกระทบของสารเคมีทางการเกษตรต่อ BT และระดับความต้านทานของแมลงต่อ BT การศึกษาด้านเชื้อราแมลง ได้แก่การคัดเลือก การผลิตขยาย และทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียและราเขียวเมตาไรเซียม การศึกษาด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ได้แก่การผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave S.graseri* การทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยและการเก็บรักษา กิจกรรมที่ 3 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช จำนวน 24 การทดลอง ประกอบด้วย การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* คัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ Bacillus ควบคุมเชื้อ *Phytophthora parasitica Erwinia carotovora Rhizoctonia solani Colletrotrichum gloeosporioides C. capsici Ralstonia solanacearum Fusarium solani* การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคโรคยางไหลในพืชตระกูลแตง โรคเน่าสีน้ำตาลและโรคใบจุดสีน้ำตาลในกล้วยไม้ การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp และไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคที่เกิดจากไส้เดือนฝอยและเชื้อรา *Sclerotium rolfsii Fusarium oxysporum Alternaria brassicicola* กิจกรรมที่ 4 การควบคุมสัตว์ศัตรูพืช และวัชพืชโดยชีววิธี จำนวน 7 การทดลอง ประกอบด้วย การพัฒนาเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู การเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำและการสำรวจศัตรูธรรมชาติของหอยศัตรูพืช การใช้ฝอยทองควบคุมวัชพืช และการใช้ถั่วซีรูเลียมควบคุมหญ้าคา กิจกรรมที่ 5 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก จำนวน 3 การทดลอง ประกอบด้วยการพัฒนาวิธีการการผลิตขยายแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเป็นปริมาณมากและการเก็บรักษาแตนเบียนจนสามารถปรับลดต้นทุนการผลิต จากเดิมต้นทุนการผลิต 3 – 4.50 บาท/แตนเบียน 1 คู่ สามารถปรับให้ลดลงได้เหลือ 2 บาท/ 1 คู่ การจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อเป็นเหยื่ออาหารสำหรับนำไปผลิตมวนเพชฌฆาตเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร และได้วิธีการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำให้มีปริมาณมาก

Abstract

The research and development on biological control of agricultural pests was carried out for 5 years during October 2011 – September 2015. The project aimed at research and development on bio-agent for biological control of Agricultural Pests to reduce pesticide used. The research were studied both in the laboratory of Plant Protection Research and Development Office and in the farmer fields in several provinces. The project comprised 5 research activities. The first activity: Mass production and utilization of beneficial insects and mites for control of agricultural pest consisted of 7 experimentals. They were : Study on beneficial insects for control whitefly, Potential study of coccinellid predator and the butterflies predator, Development on mass production of assassin bug, Effect of temperature entomopathogenic nematodes and fungi on green lacewing. The 2nd activity: Mass production and utilization of microorganisms and entonopathogenic nematode for pest control consisted of 20 experimentals. They were : Development technology of nucleopolyhedrovirus producing from cell culture, The bioproduct development of nucleopolyhedrovirus formulations, efficacy test and application. Efficacy and application of BT. Mass production and efficacy test of entomopathogenic fungi. Mass production and efficacy test of entomopathogenic nematode. The 3nd activity: Mass Production and Utilization of microorganism for control plant pathology consisted of 24 experimentals. They were : Development Formulation of *Bacillus subtilis*. Selection and efficacy test of high potential bacillus for controlling *Phytophthora parasitica Erwinia carotovora Rhizoctonia solani Colletrotrichum gloeosporioides C. Capsici Ralstonia solanacearum Fusarium solani*., Selection and efficacy test of antagonistic bacterias for controlling *Didymella bryoniae Burkholderia gladioli Acidovorax avenae Rhizoctonia solani.* Screening of potential *Pasteuria penetrans* isolates for controlling root-knot nematodes *and* reniform nematodes. Selection and efficacy test of antagonistic fungi for controlling *Sclerotium rolfsii Fusarium oxysporum Alternaria brassicicola Fusarium oxysporum and* root-knot nematodes. The 4nd activity: Biological control of animal pests and weed consisted of 7 experimentals. They were : Mass production of *Sarcocystis singaporensis* for biological control of rodents. Species selection of predatory snail for biological Snails Pest Control. The 5nd activity: Pilot centre for mass production of bio-control agent consisted of 3 experimentals. They were : Pilot center for mass production of pink cassava mealybug parasitoid, Pilot centre for mass production of assassin Bug for controlling insect pests and pilot plant for large scale production of predatory mites.

กิจกรรมที่ 1 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช
Mass Production and Utilization of beneficial insects and mites for Pest Control

ผู้วิจัย

รจนา ไวยเจริญ ประภัสสร เชยคำแหง อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล รัตนา นชะพงษ์ พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์ อัมพร วิโนทัย สาทิพย์ มาลี อิทธิพล บรรณาการ พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์ พลอยชมพู กรวิภาสเรือง ภัทรพร สรรพนุเคราะห์

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำสำคัญ(key word)

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ศัตรูธรรมชาติ การผลิต แตนเบียน แมลงห้ำ ไรตัวห้ำ เพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง แมลงช้างปีกใส แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว ชีวภัณฑ์ แมลงหวี่ขาว มวนเพชฌฆาต ผีเสื้อตัวห้ำ แตนเบียน encasia ด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp.

บทคัดย่อ (Abstracts)

กิจกรรมการผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงศัตรูธรรมชาติเพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว และการศึกษาแมลงห้ำ แมลงเบียน เพื่อควบคุมศัตรูพืช โดยครอบคลุมการศึกษาข้อมูลพื้นฐานและประยุกต์ ทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา การประเมินประสิทธิภาพการเลี้ยงขยายให้มีปริมาณมาก ตลอดจนการนำไปใช้ประโยชน์ ดำเนินการระหว่าง ระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2558 โดยมีการทดลองทั้งสิ้น 7 การทดลอง เป็นการควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธีจำนวน 2 การทดลอง และการทดลองการผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช 5 การทดลอง ดำเนินการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธีพบว่า พบแตนเบียนสกุล *Encarsia* ออกจากตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว จำนวน 2 ชนิด ชนิดลำตัวสีดำและชนิดลำตัวสีเหลือง ยังไม่สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้ มีอัตราการเบียน 0-77.42% แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้มากพอ ทำให้ไม่สามารถทดลองการผลิตขยายแตนเบียน *Encarsia* sp. เพื่อนำไปปล่อยได้ ส่วนแมลงช้างปีกใส 3 ชนิดได้แก่ *Malada basalis Plesiochysa ramburi Chysopa carner* มีประสิทธิภาพการกินไข่และตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ใกล้เคียงกัน การเลือกใช้แมลงช้างปีกใสชนิดใดคงต้องขึ้นอยู่ว่าสามารถผลิตขยายแมลงช้างปีกใสชนิดใดได้ปริมาณมาก และง่ายที่สุด

การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืชพบว่า การผลิตมวนเพชฌฆาตตลอดชีวิตจำนวน 150 ตัวต่อกล่อง พบว่าใช้ดักแด้และหนอนนกจำนวน 1,886.10 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 12.01 บาท การศึกษาชีววิทยาของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis* epius ศัตรูธรรมชาติของเพลี้ยแป้งพบว่าระยะไข่ มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน ใกล้ฟักจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ไข่มีอายุ 3-5 วัน ระยะตัวอ่อน มี 4 ระยะ ตัวอ่อนมีอายุ 10 - 13 วัน ระยะก่อนเข้าดักแด้ จะมีลักษณะเหมือนตัวอ่อนระยะที่ 4 แต่ไม่เคลื่อนไหว มีระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ระยะดักแด้ มีอายุประมาณ 7 - 9 วัน ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางวันขนาดเล็ก

การศึกษาชนิดและศักยภาพการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp. ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชบนมันสำปะหลังพบเป็นด้วงเต่าตัวห้ำในสกุล *Stethorus* 3 ชนิด คือ*Stethorus pauperculus* (Weise), *Stethorusindira* Kapur และ *Stethorus siphonulus* Kapur อยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Coccinellidae วงศ์ย่อย Scymninae และพบว่าด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus* มีศักยภาพในการกินไรศัตรูพืชทุกระยะ จึงเหมาะสมที่จะเพาะเลี้ยงด้วงเต่าชนิดนี้ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดไรศัตรูมันสำปะหลังและไรศัตรูพืชอื่นๆ

การเก็บรักษาไข่แมลงช้างปีกใสที่ อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส และเก็บนานไม่เกิน 5 วัน จะมีเปอร์เซ็นต์การฟักไข่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และการเก็บดักแด้ที่อุณหภูมิ 10±2 จะมีเปอร์เซ็นต์การเป็นตัวเต็มวัยดีที่สุด และสามารถยืดการออกเป็นตัวเต็มวัยได้ประมาณ 2 สัปดาห์ การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* อัตรา 200 IJs ต่อ มล. และเชื้อรา *Beauveria bassiana* อัตรา $1x10^9$ cfu ต่อ มล. มีผลกระทบต่อแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* ทุกระยะการเจริญเติบโต หากใช้ร่วมกันอาจต้องหาวิธีใช้ให้เหมาะสมเพื่อลดผลกระทบที่จะเกิดกับแมลงช้างปีกใส

บทนำ (Introduction)

1.1 การควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี

แมลงหวี่ขาวใยเกลียว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Aleurodicus dispersus* Russell (Homoptera: Aleyrodidae) เป็นแมลงศัตรูพืชที่มีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ ในไต้หวัน Wen, *et al.* (1994) ศึกษาพืชอาหารของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวในไต้หวันพบว่า ลงทำลายพืชต่าง ๆ มากถึง 144 ชนิด 64 วงศ์ ชนิดของพืชอาหารจะแตกต่างกันไปตามฤดูกาล ในประเทศอินโดนีเซีย Kajita, *et al.* (1991) รายงานว่า แมลงหวี่ขาวใยเกลียวลงทาลายพืชจำพวกไม้ดอกไม้ประดับ ไม้ผล และพืชไร่ รวม 22 ชนิด 14 วงศ์ ในประเทศอินเดีย Prathapan (1996) รายงานว่า ลงทำลายพืชชนิดต่าง รวม 72 ชนิด นอกจากลงทำลายพืชอาศัยโดยตรงจากการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นพืชแล้ว แมลงหวี่ขาวยังถ่ายมูลเป็นของเหลวใสและเหนียว เมื่อตกลงบนส่วนต่าง ของต้นพืชแล้ว จะมีราดำเกิดขึ้น ทำให้ผลผลิตสกปรก และถ้าเกิดบนใบ จะทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง แตนเบียนในสกุล *Encarsia* เป็นแมลงศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของแมลงหวี่ขาว ชนิดที่สำคัญและมีการใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี ได้แก่ *Encarsia formosa* จัดเป็นชีวินทรีย์ที่มีการจำหน่ายมากที่สุดถึง 25% ของผลิตภัณฑ์ชีวินทรีย์ที่มีการจำหน่ายเป็นการค้า (Lenteren, 2546) มีการนำไปใช้ควบคุมแมลงหวี่ขาวในโรงเรือนในประเทศอังกฤษโดยนำไปใช้ควบคุมแมลงหวี่ขาวในโรงเรือนปลูกพืช เช่น มะเขือเทศ แตง มะเขือ และไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น (Weeden and Hoffman, 2009) มีการใช้ *E. formosa* ควบคุมแมลงหวี่ขาว ในโรงเรือนที่ปลูกมะเขือเทศเป็นการค้ามากถึง 90% ในประเทศเนเธอร์แลนด์ และในอีกหลายประเทศ (van Lanteren and Woets, 1988) *E. formosa* มีบทบาทเป็นทั้งตัวห้ำและตัวเบียนแมลงหวี่ขาว เป็นตัวห้ำโดยการที่ตัวเมียใช้อวัยวะวางไข่แทงผนังลำตัวตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว และใช้ปากทำให้เป็นแผล เพื่อกินน้ำเลี้ยงที่ออกมาจากตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวโดยตรง สามารถทำลายตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวได้ทุกระยะ แต่ชอบตัวอ่อนวัย 2 และดักแด้ของแมลงหวี่ขาว *Trialeurodes vaporariorum* มากกว่าระยะอื่น และชอบที่จะเข้าทาลายตัวอ่อนทุกระยะรวมทั้งดักแด้ของแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) สำหรับบทบาทเป็นตัวเบียนนั้น ตัวเต็มวัยจะเข้าทำลายแมลงหวี่ขาว โดยชอบวางไข่ในแมลงหวี่ขาวตัวอ่อนวัย 3, วัย 4, prepupa และดักแด้ เมื่อตัวหนอนแตนเบียนฟักออกจากไข่แล้ว จะอาศัยเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้อยู่ภายในตัวแมลงหวี่ขาว และเจาะผนังลำตัวแมลงหวี่ขาวออกเป็นแตนเบียนตัวเต็มวัย (Weeden and Hoffman, 2009) พบตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวถูก *E.* sp. nr. *meritoria* เบียน 0-38.88% ในพืชอาศัยต่างกัน และ 70-80% ในฝรั่ง และ พบอัตราการ

เบียนสูงถึง 60-100% โดย *E. guadeloupae* (อ้างตาม Ramani et *al*., 2002) Neuenschwander (1994) รายงานว่า แมลงหวี่ขาว *Aleurodicus dispersus* จัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญของมันสำปะหลังในไนจีเรีย ในรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา แมลงหวี่ขาวจัดเป็นแมลงที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ในการป้องกันกำจัดได้มีการค้นหาแมลงศัตรูธรรมชาติในแถบแคริบเบียน ได้มีการนำเข้าด้วงเต่าตัวห้ำ 3 ชนิด และแตนเบียน 2 ชนิด ได้แก่ *Encarsia* sp. near *haitiensis* Dozier และ *Encarsia* sp. นำมาศึกษาชนิดของแมลงอาศัยเพาะเลี้ยง และนำออกปล่อย สามารถควบคุมแมลงหวี่ขาวได้ในปี 1981 ส่วนในแอฟริกาตะวันตก หน่วยงานอารักขาของประเทศ โตโก เบนิน กาน่า และไนจีเรีย ได้ติดต่อขอรับความช่วยเหลือจาก FAO, CABI และ International Institute of Tropical Agricultural (IITA) ในการจัดทำโครงการป้องกันกาจัดแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี โดยการนำเข้าแตนเบียน *Encarsia haitiensis* และ *E. guadeloupae* ต่อมาพบว่า *E. ?haitiensis* สามารถแพร่กระจายครอบคลุมไปทั่วแหล่งที่พบการระบาดของแมลงหวี่ขาวทางตอนใต้ แต่ในทางตอนเหนือยังพบกระจายเป็นหย่อม นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ใน Guam

จากการสำรวจศัตรูธรรมชาติของแมลงหวี่ขาวในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งดำเนินการโดย Legaspi *et al.* (1996) เมื่อปี 2546-2548 มีการสำรวจพบแตนเบียนในสกุล *Encarsia* จำนวน 22 ชนิด แตนเบียนสกุล *Eretmocerus* ชนิดใหม่ 1 ชนิด ด้วงเต่าตัวห้ำ และแมลงวันตัวห้ำอีกหลายชนิด และได้มีการนำศัตรูธรรมชาติที่พบเข้าไปในสหรัฐอเมริกา เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* ในมลรัฐแคลิฟอร์เนีย อะริโซนา และเท็กซัส ได้รับผลสำเร็จเป็นอย่างดี

แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus disperses* (Russell) (Homoptera : Aleurodidae)จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่ลงทำลายพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิด เป็นแมลงศัตรูพืชท้องถิ่นใน แถบหมู่เกาะทะเลคาริบเบียน และทางตอนกลางของทวีปอเมริกา นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า แมลงหวี่ขาวใยเกลียวลงทำลายพืชในแถบอเมริกาเหนือ อเมริกาใต้ รวมทั้งในแถบทวีปแอฟริกา เอเชีย ออสเตรเลีย และพบระบาดทั่วๆไปในหมู่เกาะแปซิฟิก (Anon.,2006) ในสหรัฐอเมริการายงานว่า พบการระบาดในมลรัฐฮาวายตั้งแต่ปี 1978 ลงทำลายในพืชหลายชนิด เช่น อโวกาโด กล้วย ส้ม ส้มโอ มะพร้าว ฝรั่ง มะม่วง มะเขือ และมะละกอ เป็นต้น นอกจากนั้นในไม้ดอกไม้ประดับอีกหลายชนิด เช่น bird-of-paradise และกุหลาบ เป็นต้น (Arnold H. Hara 2011) และ Palaniswami etal., 1995 รายงานว่าในประเทศอินเดียเริ่มพบการระบาดของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว *A. disperses* ตั้งแต่ปี 1993 โดยพบว่าการระบาดในอินเดียเข้ามาทางประเทศใกล้เคียง เช่น ประเทศมัลดีฟส์ และประเทศศรีลังกา แมลงหวี่ขาวใยเกลียวจะลงทำลายทั้งในแปลงปลูกพืชผัก เช่น พริก ใน ไม้ผล เช่น กล้วย ฝรั่ง หม่อน มะละกอ พืชไร่ เช่น มันสำปะหลัง เป็นต้น (Mani. 2010) แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *A. disperses* มีวงจรชีวิต ระยะไข่ประมาณ 6-7 วัน จะพบไข่ของแมลงหวี่ขาวชนิดนี้วางเป็นวงกลมอยู่ใต้ใบพืช ซึ่งเป็นแบบฟอร์มการวางไข่ของแมลงหวี่ขาวชนิดนี้ ตัวอ่อนมี 4 ระยะใช้เวลาประมาณ 12-14 วัน หลังจากนั้นจะเข้าดักแด้ มีระยะเวลา 2-3 วัน ระยะไข่ถึงตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 23 - 30 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 13-22 วัน ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช ถ้ามีการระบาดอย่างรุนแรงก็จะทำให้ต้นพืชไม่เจริญเติบโต และตายได้ ตัวอ่อนในระยะ 2-3 และระยะดักแด้จะสร้างไขสีขาวขึ้นปกคลุมลำตัว ช่วงการระบาดอยู่ระหว่าง เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม (Geetha. 2000) การควบคุมโดยใช้สารเคมีค่อนข้างยากเนื่องจากแมลงหวี่ขาวใยเกลียวอาศัยอยู่ใต้ใบพืช และมีไขสีขาว และเส้นใยปกคลุมค่อนข้างหนาทำให้การใช้สารเคมีไม่ได้ผลเท่าที่ควร ดังนั้นในประเทศอินเดียจึงมีการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติ Mani. 2010 รายงานว่าในการสำรวจแมลงศัตรูธรรมชาติในอินเดีย พบแมลงศัตรูธรรมชาติ 50 ชนิดด้วยกัน แบ่งเป็นแมลงเบียน 3 ชนิด แมลงห้ำ 45 ชนิด และเชื้อรา 2 ชนิด แมลงเบียน 3 ชนิดได้แก่ *Encarsia haitiensis Encarsia quadeloupae* และ *Leptus* sp. แมลงห้ำ เช่น ด้วงเต่า ได้แก่ *Anegleis cardoni* (Weise) *Anegleis perrotteti* (Mulsant) *Axinoscymnus puttarudriahi* Kapur & Munshi. *Cheilomenes sexmaculata* (F).

Cryprolaemus montrouzieri *Chilocorus nigrita* (F). เป็นต้น แมลงช้างปีกใส 1 ชนิด คือ *Mallada astus* แมงมุม 1 ชนิด *Oxyopius* sp. Cybocephalus sp. 1 มด และนกบางชนิด Gopi *et al.* 2001 กล่าวว่าแมลงช้างปีกใส *M. astus* เป็นแมลงห้ำทั่วไปที่พบลงทำลายแมลงหวี่ขาวใยเกลียวในทางตอนใต้ของอินเดีย

ดังนั้นการใช้แมลงศัตรูธรรมชาติจึงมีบทบาทในการควบคุมโดยชีววิธี หรือภายใต้ระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน เช่นในอินเดียมีรายงานว่า มีการใช้หลายๆวิธีการในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว ใช้ทั้ง วิธีเขตกรรม วิธีกล สารเคมี และใช้การควบคุมโดยชีววิธีร่วมด้วย ได้มีการศึกษาประสิทธิภาพของ แมลงช้างปีกใส *M. astus* พบว่าในระยะตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใส 1 ตัว สามารถกินตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ประมาณ 200 ตัว (G.2000) จากการสำรวจในประเทศมาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ใต้หวัน ออสเตรเลีย ฮาวาย ประเทศกานะ และประเทศแถบหมู่เกาะแปซิฟิก พบว่าแตนเบียน *Encarsia* sp.มีประสิทธิภาพมากในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว (Waterhouse and Norris, 1989.) จากการสำรวจในประเทศไทยในสถาพการระบาดพบแมลงศัตรูธรรมชาติหลายชนิด เช่น แตนเบียน *Encarsia* sp. ด้วงเต่า และแมลงช้างปีกใส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการใช้ประโยชน์จากแมลงศัตรูธรรมชาติ คือ แมลงช้างปีกใส 3 ชนิด *Malada basalis* *Plesiochysa ramburi* และ*Chysopa carner* นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

1.2 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช

มวนเพชฌฆาต (assassin bug) *Sycanus versicolor* Dohrn (Hemiptera: Reduviidae) เป็นมวนตัวห้ำชนิดใหม่ที่ยังไม่เคยมีข้อมูลรายละเอียดวิธีการผลิตขยายอย่างเป็นระบบมาก่อน ทราบแต่ว่ามีคุณสมบัติการทำลายหนอนเหมือนกับมวนพิฆาต (stink bug) *Eocanthecona furcellata* (Wolff) (Hemiptera : Pentatomidae) และทำลายหนอนได้หลายชนิดเช่นเดียวกัน การเลี้ยงขยายให้ได้ปริมาณมากสามารถทำได้ง่ายและง่ายกว่ามวนพิฆาต รวมทั้งต้นทุนการผลิตต่ำกว่ามวนพิฆาต แต่ประสิทธิภาพในการทำลายหนอนไม่สูงเท่ากับมวนพิฆาต รัตนาและคณะ (2548) รายงานว่ามวนเพชฌฆาตสกุล *Sycanus* ที่พบมากในประเทศไทยมี 3ชนิด คือ *S. versicolor*, *Sycanus collaris* Fabricius และ *Sycanus croceovittatus* Dohrn. ซึ่งเป็นมวนตัวห้ำที่ระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย ทำลายหนอนศัตรูพืช และทำลายหนอนได้หลายชนิด สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติแต่มีปริมาณน้อย สำหรับ *S. versicolor* เป็นชนิดที่พบบ่อยและพบมากกว่าอีก 2 ชนิด มวนเพชฌฆาต *S. collaris* และ *S. croceovittatus* มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในอดีต รัตนา (2545 – 2546) รายงานว่า *S. collaris* สามารถเลี้ยงได้ด้วยหนอนนก มีระยะตัวอ่อน 72 วัน ตัวเต็มวัย 100 วัน จำนวนไข่ 104.97 ฟอง ตลอดชีวิตกินหนอนนก 50 ตัว และ กินหนอนกระทู้ผัก 95.95 ตัว Das and Mukhopadhyay (2008) รายงานว่า *S. croceovittatus* เลี้ยงด้วยปลวก (*Coptotermes* sp.) มีระยะตัวอ่อน 41.34 - 75.622 วัน ระยะวางไข่ 25.42 - 61.25 วัน วางไข่ได้ 134.37 ฟอง นำไปใช้ควบคุมหนอนในชาและลิ้นจี Sahayaraj (2002) กล่าวว่า มวนเพชฌฆาต *Rhynocoris marginatus* (F.) สามารถเลี้ยงขยายพันธุ์ได้ดีด้วยหนอนผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* โดยสามารถกินหนอนผีเสื้อข้าวสารได้วันละ 8 ตัว/มวน 1 ตัว Sahayaraj and Sathiamoorthi (2002) กล่าวว่ามวนเพชฌฆาต *R. marginatus* เลี้ยงได้ด้วยหนอนผีเสื้อข้าวสาร สามารถกินแมลงศัตรูพืชได้เกือบ 25 ชนิด เช่น หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย และได้นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในแปลงถั่วเหลือง ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น Sahayaraj and Paulraj (2001) รายงานว่ามวนเพชฌฆาตชนิด *R. marginatus* เมื่อเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผักสามารถวางไข่ได้ 405.28 $\pm$ 22.15 ฟอง มีวงจรชีวิต103.933 วัน Grundy and Maelzer (2002) รายงานว่า ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตชนิด *Pristhesancus plagipennis* (Walker) สามารถกินหนอนเจาะสมอฝ้ายที่มีขนาดเล็ก - กลาง มากกว่า 160 ตัว/ 9-12 อาทิตย์/ มวน 1 ตัว สามารถเลี้ยงขยายปริมาณและ นำไปปล่อยเพื่อควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายในอัตรา 1 ตัว/ แถวยาว 1 เมตร Grundy (2007) รายงานว่า

มวนเพชฌฆาต *P. plagipennis* เป็นศัตรูธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพที่ใช้ควบคุมหนอน *Helicoverpa* และ *Creontiades* สำหรับมวนเพชฌฆาต *S. collaris* และ*S. croceovittatus* ในประเทศไทยได้มีการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชเช่นในอ้อย และป่าไม้ แต่รัตนา (2551) พบว่า *S. versicolor* สามารถใช้หนอนนกเพียงชนิดเดียวนำมาเป็นเหยื่อเลี้ยงขยายได้ทำให้มีต้นทุนการเลี้ยงต่ำ นอกจากนี้ยังมีนิสัยในการกินหนอนว่องไวกว่าและกินจุกว่า *S. collaris และ S. croceovittatus* ดังนั้น *S. versicolor* จึงเป็นมวนเพชฌฆาตตัวใหม่อีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพน่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มทางเลือกในการนำมาช่วยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี รัตนา (2555) รายงานว่าจากการศึกษาศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายหนอนนกเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงมวนตัวห้ำ พบว่าขนาดความยาวหนอนนกที่สมบูรณ์ที่เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำคือ 2.6 $\pm$ 0.13 เซนติเมตร (2.4 - 2.8 เซนติเมตร) มีน้ำหนัก 0.114 กรัม/ตัว ดักแด้ที่มีขนาดใหญ่และสมบรูณ์มีน้ำหนัก 0.096 กรัมต่อตัว หรือดักแด้หนัก 1000 กรัม มีจำนวนดักแด้ 10,450 ตัว และการผลิตหนอนนกขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำ 13,976 ตัว มีน้ำหนัก 1593.26 กรัม ถ้าเลี้ยงต่อไปเป็นดักแด้จะสามารถผลิตดักแด้ได้ทั้งหมดหนัก 1337.42 กรัม โดยใช้อาหารไก่ใหญ่เลี้ยงหนัก 5,670 กรัม ใช้ต้นทุนค่าอาหารในการผลิต 79 บาท

รัตนา (2551) รายงานว่ากองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการวิจัยการนำมวนตัวห้ำได้แก่มวนพิฆาต (stink bug) *E. fucellata* (Wolff) ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชได้แก่ หนอนกระทู้หอม, หนอนเจาะสมอฝ้าย, หนอนกระทู้ผักได้ประสบผลสำเร็จสูงในองุ่น, หน่อไม้ฝรั่ง, ถั่วฝักยาว, ถั่วเหลือง ทั้งมีการศึกษาการผลิตอย่างเป็นระบบสามารถผลิตเป็นชีวภัณฑ์ได้ แต่ไม่สามารถใช้หนอนนกเพียงชนิดเดียวนำมาเป็นเหยื่อผลิตขยายมวนพิฆาตได้ เพราะจะทำให้มวนระยะตัวอ่อนตายสูงถึง 50 % ต้องใช้หนอนนกร่วมกับหนอนกระทู้ผักนำมาเป็นเหยื่อผลิตขยายมวนพิฆาตซึ่งจะทำให้มวนระยะตัวอ่อนตายเพียง 26.71 % ทำให้การผลิตมวนพิฆาตมีต้นทุนการผลิตสูง เพราะในการผลิตหนอนกระทู้ผักเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงมวนพิฆาตต้องใช้อาหารเทียมซึ่งมีราคาแพง ในขณะที่มวนเพชฌฆาต *S. versicolor* สามารถใช้หนอนนกเพียงชนิดเดียวนำมาเป็นเหยื่อเลี้ยงขยายได้ซึ่งการผลิตหนอนนกเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงมวนเพชฌฆาตใช้อาหารไก่เลี้ยงซึ่งมีราคาถูกกว่ามากและไม่เสียแรงงานในการเตรียมอาหาร ทำให้มีต้นทุนการเลี้ยงต่ำกว่าการเลี้ยงมวนพิฆาต ดังนั้นมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* จึงเป็นมวนตัวห้ำอีกชนิดหนึ่งที่มีประสิทธิภาพน่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มทางเลือกในการนำมาช่วยควบคุมหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และ หนอนเจาะสมอฝ้าย ซึ่งเป็นหนอนศัตรูพืชที่กำลังมีปัญหาการระบาดในกระเจี๊ยบเขียว หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ในปัจจุบันและมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆเนื่องจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการผลิตขยาย มวนเพชฌฆาต *S. versicolor* จึงสมควรทำการศึกษาอย่างรีบด่วนเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับนำไปผลิตขยายและนำไปใช้ควบคุมหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และ หนอนเจาะสมอฝ้ายในพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร เพื่อรักษาสมดุลธรรมชาติให้ยั่งยืนต่อไป

ในอนาคตการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีจะเป็นองค์ประกอบหลักที่จะทำให้เกิดความสำเร็จต่อแนวทางการแก้ไขปัญหาทั้งปัญหาศัตรูพืชที่ทำลายผลผลิตทางการเกษตร และการป้องกันสิ่งแวดล้อมของระบบนิเวศในธรรมชาติ ดังนั้นความพยายามในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีจึงเป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ในปัจจุบันและอนาคต

มวนเพชฌฆาต เป็นแมลงห้ำที่มีประสิทธภาพ มีคุณสมบัติการทำลายหนอนเหมือนกับมวนพิฆาตและทำลายหนอนได้หลายชนิดเช่นเดียวกัน จึงแมลงห้ำอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อเพิ่มทางเลือกในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี แต่ขั้นตอนการวิจัยและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากแมลงห้ำยังไม่สมบรูณ์

ขั้นตอนที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งต่อการนำมวนเพชฌฆาตไปใช้ คือ

1. การศึกษา และพัฒนาเทคนิคการผลิตมวนเพชฌฆาต

2. การวิจัยและพัฒนาขั้นสุดท้าย ซึ่งมีความสำคัญมาก เพื่อการพัฒนาไปสู่โรงงานต้นแบบ คือการพัฒนาการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติที่เหมาะสม ให้ได้ปริมาณมาก มีคุณภาพ และประสิทธิภาพดี ทราบต้นทุนการผลิตแต่ละขั้นตอน ผลิตได้เป็นระบบ และรวดเร็ว

ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการผลิตขยายมวนเพชฌฆาตจำเป็นต้องทราบข้อมูลอย่างละเอียดทุกขั้นตอนก่อนนำไปไปพัฒนาสู่โรงงานต้นแบบ หรือก่อนการถ่ายทอดเทคโนโลยีไปสู่เกษตรกรและภาคเอกชนที่เกี่ยวข้องกับระบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติ

แมลงในอันดับ Lepidoptera กว่า 99 เปอร์เซ็นต์จัดเป็นศัตรูพืช แต่ในจำนวนนี้มีอยู่ประมาณ 120 ชนิดหรือประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าอยู่ใน subfamily Miletinae family Lycaenidae ดำรงชีวิตโดยกินแมลงอื่นเป็นอาหาร เช่น ตัวอ่อนมด และแมลงในอันดับ Homoptera (Pierce 1995). ในประเทศอินเดียAitken 1894 ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่าผีเสื้อในสกุล Spalgis หรือเรียกว่าผีเสื้อหนอนหน้าลิง apefly, *Spalgis epius* (Lepidoptera: Lycaenidae: Miletinae) จัดว่าเป็นตัวห้ำที่สำคัญของเพลี้ยแป้งเป็นตัวห้ำที่ลงทำลายเพลี้ยแป้งในหลายสกุล เช่น ในสกุล *Pseudococcidae* sp. *Ferriisia* sp. และ *Maconellicoccus* sp. (Anegunda et.al. 2010) นอกจากนั้นยังพบลงทำลายเพลี้ยอ่อน ตัวอ่อนเพลี้ยจักจั่น และเพลี้ยหอย (Balduf, 1938) ในประเทศอัฟริการายงานว่า ผีเสื้อในสกุล Spalgis จัดเป็น bioagents ชนิดหนึ่ง (Ackery 1990) Gowda et. al. 1996 รายงานว่า *S. epius* เป็นตัวห้ำที่สำคัญของเพลี้ยแป้งในประเทศอินเดีย ตัวหนอนของผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* มีประสิทธิภาพมากในการควบคุมเพลี้ยแป้ง *Planococcus citri* ในต้นกาแฟ และเพลี้ยแป้ง *Maconellicoccus hirsutus* ในต้นหม่อน (mulberry) Mani and Krishnamoorthy, 1996 รายงานว่าหนอนผีเสื้อ S. *epius* ลงทำลายได้ทั้งเพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอย

ในประเทศไทย บุปผา และชลิดา (2543) รายงานว่า หนอนผีเสื้อชนิดนี้เป็นตัวห้ำ พบลงทำลายเพลี้ยแป้ง *P. lilacinus* และ *P. minor* ตัวหนอนมีลักษณะขนาดเล็ก ลำตัวยาวประมาณ 5-10 มม. กว้าง 3.0 -3.5 มม .ลำตัวประกอบด้วยขนเล็กๆละเอียด และปกคลุมด้วยสารสีขาวคล้ายแป้ง ทำให้ดูคล้ายเพลี้ยแป้ง ดักแด้สีดำลักษณะคล้ายหอยตัวเล็กๆหรือบางรายงานกล่าวว่าดักแด้มีลักษณะคล้ายหน้าลิงจึงมีชื่อเรียกว่าผีเสื้อหนอนหน้าลิง Apefly ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางวันขนาดเล็ก ปีกด้านบนสีน้ำตาลแกมเทาด้านล่างสีขาวอมเทา Lohman and Samarita, (2009) รายงานว่า ในแถบทวีปเอเชียพบผีเสื้อชนิดนี้ในประเทศบังคลาเทศ อินเดีย พม่า ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ เกาะชวา ออสเตรเลีย ไต้หวัน จีน (มณฑลไหหนานและยูนาน) ลาว เวียดนาม สิงค์โปร์ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และประเทศไทย จากการสำรวจพบตัวหนอนของ *S. epius* เป็นตัวห้ำของเพลี้ยแป้งในน้อยหน่า มัมสำปะหลัง มะละกอ และมะเขือ สอดคล้องกับประเทศอินเดียรายงานว่า *S. epius* เป็นตัวห้ำที่สำคัญของเพลี้ยแป้ง แต่ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาด้านชีววิทยาของ *S. epius* วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเรื่องนี้เพื่อทำการศึกษาชีววิทยา การเพาะเลี้ยงโดยใช้เพลี้ยแป้งเป็นเหยื่ออาหาร เพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงและศึกษาศักยภาพการเป็นตัวห้ำของผีเสื้อตัวห้ำ *S.* epius ต่อไปทราบชนิด ชีววิทยา และประสิทธิภาพของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis epius* เพื่อเลี้ยงขยายในปริมาณมาก

ไรศัตรูพืชที่มีรายงานการระบาดทำความเสียหายพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ทั้งไม้ดอกและไม้ประดับมักจะทำลายพืชด้วยการดูดกินน้ำเลี้ยง อยู่ที่ใบหรือผล โดยอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และสร้างเส้นใยขึ้นปกคลุมกลุ่มไข่ ตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ไรแมงมุมที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย ส่วนใหญ่เป็นไร

แมงมุมที่อยู่ในวงศ์ย่อย Tetranychinae ชนิดที่สำคัญ ได้แก่ ไรแดงหม่อน*Tetranychus truncatus* Eharaเป็นไรศัตรูสำคัญของมันสำปะหลัง ถั่วฝักยาว มันเทศ กระเจี๊ยบ เป็นต้นไรแมงมุมคันซาวา *Tetranychus kanzawai* Kishidaเป็นไรศัตรูสำคัญของมันสำปะหลัง กุหลาบ มะละกอ ฝ้าย สตรอเบอรี่ เป็นต้นไรแดงมันสำปะหลัง*Oligonychus biharensis* (Hirst) เป็นไรศัตรูสำคัญของมันสำปะหลังชมพู่ ฝรั่ง ขนุน ทุเรียน และกุหลาบ เป็นต้นและไรแดงแอฟริกัน *Eutetranychus africanus* (Tucker) เป็นไรศัตรูสำคัญของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ทุเรียน มะละกอ ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว มันสำปะหลัง(วัฒนาและคณะ, 2544)

ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชมีหลายชนิด ความสามารถในการกินเหยื่อ และการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมแตกต่างกันไปสมหมาย (2545) พบด้วงเต่าในสกุล *Stethorus*6 ชนิด ได้แก่ *Stethorusindira* Kapur, *Stethorus pauperculus* (Weise), *Stethorusrani* Kapur, *Stethorus siphonulus* Kapur, *Stethorus tetranychi* Kapur, *Stethorus vinsoni* Kapur ซึ่งทุกวัยเป็นตัวห้ำของไรศัตรูพืช ตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของด้วงตัวห้ำสามารถกินไรศัตรูพืชได้ปริมาณมากและรวดเร็ว นอกจากนั้นยังกินแมลงตัวเล็กๆ ชนิดอื่นๆได้ด้วย เช่น เพลี้ยหอย เพลี้ยแป้ง เป็นต้น

จุรีรัตน์ และคณะ (2551) รายงานว่า *S. pauperculus* สามารถกินระยะไข่ของไรสองจุด *T. urticae* ได้ 144 ฟองต่อวัน และสามารถกินระยะไข่ของไรแดงหม่อน *T. truncatus* ได้ 102.90 ฟองต่อวัน ศิริลักษณ์ และนุชรีย์(2555; 2556) รายงานว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. indira* สามารถกินระยะไข่ และระยะตัวอ่อนของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*ได้146.85 ฟอง และ 49.35 ตัวต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบกับตัวห้ำของไรศัตรูพืชชนิดอื่น Naher*et. al*. (2005) พบว่า ตัวเต็มวัยของด้วงเต่าตัวห้ำ *S. puntillum* Weise สามารถกินระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของไรสองจุด *T. urticae* ได้มากกว่า ตัวเต็มวัยของไรตัวห้ำ *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot และตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟตัวห้ำ *Scolothrips sexmaculatus* Pergande

การศึกษาด้วงเต่าตัวห้ำศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทราบข้อมูลศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำ*S. pauperculus*ในการกินไรศัตรูพืชชนิดต่างๆเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการวิจัยพัฒนาต่อยอดในการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีและการบริหารศัตรูพืชต่อไป

เนื่องจากปัจจุบันในสภาพอากาศของโลกที่ร้อนขึ้น ทำให้แมลงหลายๆชนิดมีการเปลี่ยนแปลงวงจรชีวิตหรือพฤติกรรมต่างๆ แมลงศัตรูธรรมชาติก็เช่นกันในสภาพอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปมากๆก็อาจจะทำให้วงจรชีวิต ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเปลี่ยนไปได้ การศึกษาระดับอุณหภูมิจะนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการ การยืดอายุการนำแมลงช้างปีกใสไปใช้ได้นานขึ้น จากรายงานของ Fujiwara and Nomura, (1999) พบว่า อุณหภูมิและความยาวของช่วงแสงในแต่ละวันมีผลกระทบต่อการพัฒนาของแมลง โดยเฉพาะแมลงช้างปีกใสเป็นแมลงศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพในการเป็น Bioagent ในแมลงศัตรูพืชหลายๆชนิด การศึกษาผลของอุณหภูมิเพื่อที่จะเป็นประโยชน์ในการนำไปปรับใช้ทั้งในการนำไปควบคุมศัตรูพืช การเก็บรักษา และนำไปพัฒนาการเลี้ยงแมลงชนิดนี้ในสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป แมลงช้างปีกใส (Green Lawings) เป็นแมลงศัตรูธรรมชาติที่มีประโยชน์มากชนิดหนึ่ง จัดอยู่ในอันดับ Neroptera วงศ์ Chrysopidae. เป็นตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถทำลายเหยื่อศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น ไข่และตัวอ่อนของผีเสื้อบางชนิด เพลี้ยอ่อน, ไรแมงมุม, เพลี้ยหอย, เพลี้ยแป้ง, เพลี้ยไก่แจ้, เพลี้ยจักจั่น, ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว และเหยื่อศัตรูพืชอีกหลายชนิดที่ลำตัวอ่อนนุ่ม จึงทำให้แมลงช้างปีกใสเป็นแมลงห้ำที่ได้รับความสนใจในหลายๆประเทศ ทั่วโลกพบแมลงช้างปีกใสอยู่หลายสายพันธุ์ เช่น ประเทศจีน พบแมลงช้างปีกใส *Chrysoperla sinica* ในสหรัฐอเมริกาพบ แมลงช้างปีกใส *Chrysoperla carnea* และ *Chrysoperla rufilabris* ซึ่งแมลงช้างทั้ง 2 ชนิดนี้ ในต่างประเทศมีการผลิตขยายและ

จำหน่าย และจากการค้นข้อมูลทำให้ทราบว่ามีข้อมูลน้อยมากที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตของแมลงช้างปีกใสในสภาพอุณหภูมิต่างๆ Tauber&Tauber, 1981 รายงานว่า ระยะตัวอ่อนของ *Chrysopa perla* ดำรงชีวิตอยู่ได้ไม่เกิน 3 วันที่อุณหภูมิ -17°c และหลังจากนั้น แต่ Sagne & Canard, 1986 ได้รายงานว่า *Chrysopa perla* สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ที่ -6°c และตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสสามารถอยู่รอดได้ถึง 97% ตลอดช่วงฤดูหนาวในแถบอเมริกาเหนือ

แมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider (Neuroptera : Chrysopidae) เป็นแมลงห้ำที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง สามารถพบแมลงศัตรูธรรมชาติชนิดนี้ ในแหล่งที่มีเพลี้ยแป้งระบาด และจากการประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยแป้งพบว่า แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* สามารถกินเพลี้ยแป้งได้ถึง 400 - 800 ตัว ตลอดระยะการเป็นตัวห้ำ และสามารถกินได้ทุกระยะของเพลี้ยแป้ง (ประภัสสร และคณะ 2553) นอกจากเพลี้ยแป้งแล้วแมลงช้างปีกใส ยังสามารถใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวไรศัตรูพืช ไข่ และตัวหนอนผีเสื้อขนาดเล็ก เป็นต้นปัจจุบันมีการใช้สารชีวินทรีย์ หลายชนิดร่วมกันในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่อที่จะผลิตพืชที่ปลอดภัยต่อการบริโภค และต่อสิ่งแวดล้อม มีสารชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ หลายชนิด เช่น ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และ เชื้อราโรคแมลง ซึ่ง สารชีวินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* จัดอยู่ในวงศ์ Seinemematidae เป็นสารชีวินทรีย์ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุม แมลงศัตรูพืชได้หลากหลายชนิด ไส้เดือนฝอย จะเข้าทำลายแมลง ทางช่องเปิดธรรมชาติ และชอนไชเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง เช่น ทางปาก ทวาร รูหายใจ และเข้าสู่ระบบเลือด แล้วจะปล่อยแบคทีเรียออกมาแพร่กระจายในเลือดแมลง ทำให้แมลงตายภายในเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สามารถใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ หลายชนิด เช่น ใช้ควบคุมหนอนกินใต้ผิวเปลือก ลองกอง (*Cossus* sp.) ใช้ควบคุมตัวอ่อนด้วงหมัดผักในผักกาดหัว (*Phyllotretra sinuate*) ควบคุม หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง (*Spodoptera exigua*) และควบคุมด้วงงวงมันเทศ (*Cylas formicarius*) เป็นต้น (วัชรี และคณะ 2534) เชื้อราโรคแมลง เชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* เป็นเชื้อราทำลายแมลงสามารถเข้าทำลายแมลงได้หลายชนิด เช่นกัน จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Moniliales อันดับ (Order) Deutesomycetes การเข้าทำลายแมลงโดยสปอร์เชื้อราเข้าสู่แมลงทางผนังลำตัว รูหายใจ หรือบาดแผลบนผนังลำตัว เชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* หรือเชื้อราขาว ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดดังที่กล่าวแล้ว เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว และเพลี้ยแป้ง เป็นต้น สปอร์ของเชื้อราจะเข้าสู่ผนังลำตัวของแมลง รูหายใจ หรือบาดแผลบนผนังลำตัว เมื่อความชื้นเหมาะสมสปอร์จะแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลงออกมาได้ ในปัจจุบันการทำการเกษตรเริ่มตระหนักถึงพิษภัยจากการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช เนื่องจากส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้ใช้ และส่งผลต่อสิ่งแวดล้อม ดังกล่าว การกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยใช้ วิธีชีววิธีจึงเป็น ทางเลือกที่เกษตรกรให้ ความสนใจอย่างมาก การใช้เชื้อราโรคแมลง และ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง จึงเป็นสารชีวินทรีย์ที่มีผู้ให้ความสนใจเป็นอย่างมาก ซึ่ง สารชีวภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิด และแมลงช้างปีกใส นี้มีประสิทธิภาพสามารถที่จะทำลายหรือควบคุมแมลงศัตรูพืชทำให้แมลงศัตรูพืชตายไปในที่สุดและ หลังจากแมลงตาย ชีวินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ไส้เดือนฝอย และเชื้อรา สามารถแพร่กระจายได้ตามธรรมชาติ และเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชต่อๆไป แต่ยังไม่มีรายงานวิจัยที่สามารถบอกได้อย่างชัดเจน ต่อผลกระทบ ของ เชื้อราโรคแมลงและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ต่อแมลงที่มีประโยชน์ต่างๆ หรือแมลงนอกเป้าหมาย จากรายงานในต่างประเทศได้มีการศึกษาผลกระทบของไส้เดือนฝอย 3 ชนิด คือ *Steinernema feltiae*, *Steinernem carpocapsae* และ *Heterorhabditis bacteriophora* พ่นลงในตัวอ่อนของ ด้วงเต่า *Adalia bipunctat*(Coleoptera: Coecinellidae) และตัวอ่อน แมลงช้างปีกใส *Chrysoperla*

carnea (Neuroptera: Chrysopidae) ศึกษาในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 3 อุณหภูมิ คือ 15 20 และ 25 °C และใช้อัตราใส้เดือนฝอย ที่ 500 2,500 และ 5,000 [IJs]/ml พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ และทดลองที่อุณหภูมิ ต่างๆ 3 อุณหภูมิ มีผลกระทบต่อ ตัวอ่อน ด้วงเต่า *A. bipunctata* และ แมลงช้างปีกใส *C.carnea* โดยขึ้นกับระดับ อุณหภูมิ (Rojht et.al. 2009) สำหรับเชื้อราจะงอกสร้างเส้นใยภายใน เมื่อแมลงตายเส้นใยจะแทงผ่านผนังลำตัวแมลง Dromph and Vestergaard 2002 รายงานว่า *B bassiana* ไม่ทำอันตรายกับแมลงที่มีประโยชน์ใน ดิน และ Thungrabeab and Tongma 2007 รายงานว่า *B bassiana* Bb.5335 และ *M. anisopliae* Ma. 7965 เชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้มีความปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติ และแมลงที่มีประโยชน์ในดิน เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามเพื่อความถูกต้อง และมั่นใจเราควรมีการทดสอบกับแมลงช้างปีกใสชนิด *P. ramburi* ดังนั้นการศึกษาผลกระทบของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และเชื้อราโรคแมลงต่อแมลงศัตรู ธรรมชาติแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* จึงมีความสำคัญ และน่าสนใจเพื่อ สามารถนำไปใช้ร่วมกันในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methology)

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 การควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี

การทดลองที่ 1.1.1 เทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้แตนเบียน *Encarsia* sp. เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. พืชอาหารเลี้ยงแมลงหวี่ขาว เช่น มันสำปะหลัง
2. อุปกรณ์เลี้ยงแมลง ได้แก่ กรงเลี้ยงแมลง กล่องเลี้ยงแมลง ถ้วยพลาสติก ปากคีบ
3. หลอดดูดแมลง หลอดทดลอง ผ้าดิบ ผ้าตาข่าย พู่กัน น้ำผึ้ง กระดาษชำระ สำลี
4. กระบอกฉีดน้ำ ยางรัด แอลกอฮอล์ ฯลฯ
5. อุปกรณ์การปลูกพืช เช่น กระถางต้นไม้ ดิน ปุ๋ย พลั่วมือ ฯลฯ
6. เครื่องวัดอุณหภูมิ-ความชื้น (Thermo hygrometer)
7. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
8. กล้องจุลทรรศน์

- วิธีการ

1. สำรวจและเก็บรวบรวมแมลงหวี่ขาว และแตนเบียนสกุล *Encarsia*

เก็บรวบรวมใบ ไม้ผล วัชพืช และมันสำปะหลัง ที่พบไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย แมลงหวี่ขาว เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ นำตัวอย่างพืชแต่ละใบมาเก็บในกรง และหลอดพลาสติกปิดฝาให้แน่น เฝ้าสังเกตการเจริญเติบโตของแมลงหวี่ขาว เพื่อจำแนกชนิดของ แมลงหวี่ขาวและแตนเบียนที่พบลงทำลายแมลงหวี่ขาววัยต่าง ๆ ตรวจสอบอัตราการเบียน หากพบแตนเบียนออกจากตัวอย่าง ให้เก็บรวบรวมแตนเบียน ดองในแอลกอฮอล์ 75% และบางส่วนนำไปศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- ชนิดของแมลงหวี่ขาวและแตนเบียนสกุล *Encarsia*
- ชนิดของพืชอาหารที่พบแมลงหวี่ขาว

2. ศึกษาอัตราการเบียนของแตนเบียนสกุล *Encarsia* ในสภาพแปลงมันสำปะหลัง

นำแมลงหวี่ขาวที่เก็บรวบรวมจากแปลงมันสำปะหลัง ขนาดพื้นที่ประมาณ 1-10 ไร่ มาแยกเลี้ยงตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวแต่ละตัวในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิด ตรวจดูแตนเบียน นับจำนวนตัวอย่างแมลงหวี่ขาวที่ทดสอบ และจำนวนแมลงหวี่ขาวที่พบแตนเบียน เพื่อหาอัตราการเบียน

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนแมลงหวี่ขาวทั้งหมดที่ตรวจสอบ และจำนวนที่ถูกเบียน ชนิดพืช
- จำนวน และลักษณะ แตนเบียนสกุล *Encarsia* ที่พบ

3. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล *Encarsia* ในห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล *Encarsia*

เก็บใบพืชที่มีตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวจากแปลง นำมาใส่ในกรง เพื่อให้ตัวเต็มวัยวางไข่บนต้นพืชชนิดต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการทดสอบพืชอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนพืชอาหาร ได้แก่ มันสำปะหลัง ฝรั่ง หญ้ายาง ตำแยแมว มะเขือ พริก

ถั่วเขียว ถั่วดำ และคริสต์มาส เพื่อหาวิธีเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นพืชที่สามารถปลูกได้เป็นปริมาณมากและง่าย รวมทั้งศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นพืช

การบันทึกข้อมูล

- ชนิดพืชที่แมลงหวี่ขาวใยเกลียวชอบวางไข่และเจริญเติบโตได้ดี
- วงจรชีวิตของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว
- พฤติกรรมการวางไข่ และการเจริญเติบโต

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล *Encarsia* ในห้องปฏิบัติการ

ปล่อยแตนเบียน *Encarsia* sp. ใส่ในถุงตาข่ายที่หุ้มใบฝรั่งที่มีตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวแต่ละวัย ปล่อยไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง ให้แตนเบียนลงเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว เฝ้าสังเกต จนพบแตนเบียนตัวเต็มวัยรุ่นใหม่ออกจากแมลงหวี่ขาวที่ใช้เพาะเลี้ยง นับจำนวนแตนเบียนที่ได้

การบันทึกข้อมูล

- ข้อมูลวงจรชีวิต ของแตนเบียนสกุล *Encarsia*

-จำนวนแมลงหวี่ขาวที่ผลิตได้ และจำนวนที่ถูกเบียน ชนิดพืช ระยะเวลา

- เวลาและสถานที่

- ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558
- พื้นที่ปลูกมันสำปะหลังใน จังหวัด ชลบุรี และนครราชสีมา

และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 1.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแมลงช้างปีกใสในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

วิธีดำเนินการ

-อุปกรณ์

- แมลงช้างปีกใส 3 ชนิด *Malada basalis Plesiochysa ramburi Chysopa carner*
- แมลงหวี่ขาวใยเกลียว (ระยะไข่ ระยะตัวอ่อน)
- กล่องสี่เหลี่ยมขนาด 35×45×12 เซนติเมตร
- กล่องสี่เหลี่ยมขนาด 18×26×10 เซนติเมตร
- ผ้าขาวบาง,ยางยืด,สำลี
- กระดาษทิชชู,กระดาษไข,น้ำผึ้ง.ยีสต์
- ฟักทอง
- ไข่ผีเสื้อข้าวสาร
- ถุงกระดาษเก็บตัวอย่างแมลง
- อุปกรณ์นับแมลง
- พู่กัน

- วิธีการ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เดือนตุลาคม 2553 - กันยายน 2554 วางแผนการทดลองแบบ RCB 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ใช้แมลงช้างปีกใสซ้ำละ 10 ตัว

1.1 เลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงแมลงช้างปีกใส

เก็บรวบรวมเพลี้ยแป้ง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆมาเลี้ยงบนผลฟักทอง โดยใช้ฟักทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-25 เซนติเมตร ใส่ในกล่องขนาด 35×45×12 เซนติเมตร จำนวน 4 -5 ลูกต่อกล่อง รองพื้นกล่องด้วยกระดาษเพื่อซับความชื้น เขี่ยเพลี้ยแป้งประมาณ 20 -30 ตัว ลงบนฟักทองแต่ละลูก ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบางรัดด้วยยางยืดทิ้งไว้ประมาณ 20-25 วัน เมื่อได้เพลี้ยแป้งทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อนอยู่บนผลฟักทองสำหรับนำไปใช้เลี้ยงตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใสต่อไป

1.2 เลี้ยงขยายแมลงช้างปีกใส *Malada basalis* และ *Plesiochysa ramburi*

เก็บแมลงช้างปีกใสทุกระยะจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยนำแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 40 ตัว เพศเมีย 60ตัวใส่กล่องสี่เหลี่ยมขนาด 18×26×10 เซนติเมตร ที่รองพื้นกล่องแล้วด้วยกระดาษ ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบาง ภายในกล่องวางน้ำผึ้งผสมยีสต์บนกระดาษไข เพื่อเป็นอาหารของแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัย วางแผ่นสำลีชุ่มน้ำไว้ด้านบนผ้าขาวบางเพื่อให้ความชื้นแก่ตัวเต็มวัย เปลี่ยนกล่องตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสทุกๆ 3 วัน เนื่องจากตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสจะวางไข่ไว้ในกล่อง ต่อจากนั้นนำฟักทองที่มีเพลี้ยแป้งจากขั้นตอนที่1 ใส่ในกล่องที่มีไข่ของแมลงช้างปีกใสเพื่อเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส โรยกระดาษทิชชูที่ตัดเป็นริ้วๆลงในกล่อง ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบางวางไว้ประมาณ 15-20 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนเจริญเติบโต จนกระทั่งเข้าดักแด้ จากนั้นเก็บดักแด้ เพื่อให้ฟักเป็นตัวเต็มวัยต่อไป วิธีการเพิ่มประชากรแมลงช้างปีกใส ทำโดยนำแมลงช้างปีกใสที่เปลี่ยนจากกล่องเดิมนำไปเลี้ยงในกล่องใหม่มีวิธีการทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ในการทดลองนี้ใช้ระยะไข่ และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีก

1.3 เลี้ยงขยายแมลงช้างปีกใส *Chysopa carner*

นำตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสมาใส่กล่องสี่เหลี่ยมขนาด 18×26×10 เซนติเมตรที่รองพื้นกล่องแล้วด้วยกระดาษปิดกล่องด้วยผ้าขาวบางภายในกล่องวางน้ำผึ้งผสมยีสต์บนกระดาษไขเพื่อเป็นอาหารของแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัย วางแผ่นสำลีชุ่มน้ำไว้ด้านบนผ้าขาวบางเพื่อให้ความชื้นแก่ตัวเต็มวัย เปลี่ยนกล่องตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสทุกๆ 3 วัน ตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสจะวางไข่ไว้ในกล่องใส่กระดาษทิชชูที่ฉีกเป็นริ้วๆลงในกล่องที่นำตัวเต็มวัยออกแล้ว โรยไข่ผีเสื้อข้าวสารให้เป็นอาหารตัวอ่อน เลี้ยงเพิ่มปริมาณจนกระทั่งได้ตัวอ่อนในปริมาณที่มากพอสำหรับการทดลอง

1.4 เตรียมไข่ และตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเลี้ยงบนต้นมันสำปะหลัง

1.5 นำตัวอ่อนแมลงช้างปีกใสทั้ง 3 ชนิด ในวัยที่ 1 ที่ฟักในวันเดียวกัน มาชนิดละ 100 ตัว วางแผนการทดลอง แบบ RCB มี 10 ซ้ำ ใช้ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใสวัยเดียวกัน ซ้ำละ 10 ตัว ประกอบด้วย 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ คือ กรรมวิธีที่ 1 ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *M. basalis* กินไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียว

กรรมวิธีที่ 2 ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *M. basalis* กินตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว
กรรมวิธีที่ 3 ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* กินไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียว
กรรมวิธีที่ 4 ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* กินตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว
กรรมวิธีที่ 5 ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *C. carner* กินไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียว
กรรมวิธีที่ 6 ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *C. carner* กินตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

แต่ละกรรมวิธี ให้เหยื่ออาหารคือไข่ และตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวในปริมาณที่เพียงพอ จดบันทึกและเก็บข้อมูลปริมาณการกินทุกวัน จนกระทั้งแมลงช้างปีกใสเข้าดักแด้

- เวลาและสถานที่ ทำการศึกษาระหว่าง เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2556
ห้องปฏิบัติการ
กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช

การทดลองที่ 1.2.1 พัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาต *Sycanus versicolor* Dohrn

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ชั้นเลี้ยงแมลง, กล่องพลาสติกขนาด 18.5 x 27.5 เซนติเมตร
2. มวนเพชฌฆาต (มวนตัวห้ำ) *S. versicol*or
3. ดักแด้หนอนนก และ หนอนนก
4. พู่กัน, ปากคีบ, กระดาษเนื้อเยื่อ และสำลี
5. อาหารเลี้ยงไก่สำหรับเลี้ยงหนอนนก
6. กล้องจุลทรรศน์
7. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

- วิธีการ

การศึกษาพัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาต ประกอบด้วย 4 การทดลองย่อย คือ

1. ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* (ปี 2554)

เพื่อหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและการผลิตไข่ของมวนเพชฌฆาต โดยศึกษากับอาหาร 5 ชนิดดังนี้

1.1 ใช้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหาร

นำมวนเพชฌฆาตระยะไข่จำนวน 1 กลุ่ม/กล่อง จำนวน 5 กล่อง เมื่อมวนฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ทุกกล่องนำมวนออกให้เหลือจำนวน 30 ตัว/กล่อง ระยะตัวอ่อนวัย 1-2 เลี้ยงด้วยดักแด้หนอนนก ระยะตัวอ่อนวัย 3 – 5 และตัวเต็มวัย เลี้ยงด้วยหนอนนก เปลี่ยนอาหารทุกวัน และเปลี่ยนกล่องที่เลี้ยง 2 ครั้ง/สัปดาห์ จนมวนเป็นตัวเต็มวัยและตาย

1.2 ใช้ดักแด้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหาร

นำมวนเพชฌฆาตระยะไข่จำนวน 1 กลุ่ม/กล่อง จำนวน 5 กล่อง เมื่อมวนฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ทุกกล่องนำมวนออกให้เหลือจำนวน 30 ตัว/กล่อง เลี้ยงด้วยดักแด้หนอนนก เปลี่ยนอาหารทุกวัน และเปลี่ยนกล่องที่เลี้ยง 2 ครั้ง/สัปดาห์ จนมวนเป็นตัวเต็มวัยและตาย

1.3 ใช้หนอนกระทู้ผักเป็นเหยื่ออาหาร

ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แต่เลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผัก

1.4 ใช้หนอนนกรวมกับดักแด้หนอนนกเป็นเหยื่ออาหาร

ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 1.1 แต่ระยะตัวอ่อนวัย 3 – 5 และตัวเต็มวัย เลี้ยงด้วยหนอนนกรวมกับดักแด้หนอนนก

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนมวนเพชฌฆาตที่ตาย วงจรชีวิต จำนวนไข่ที่มวนเพชฌฆาตผลิตได้ และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ในอาหารแต่ละชนิด

2. จำนวนที่เหมาะสมของมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* Dohrn ที่ผลิตขยายต่อภาชนะ (ปี 2555)

เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวางไข่ของมวนเพชฌฆาต โดยศึกษาจำนวนที่เหมาะสมของตัวอ่อนต่อภาชนะ, ตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ที่เลี้ยงต่อภาชนะที่ให้ปริมาณไข่ต่อตัวเต็มวัยเพศเมียสูงสุด ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อยดังนี้

2.1 จำนวนที่เหมาะสมของมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนที่ผลิตขยายต่อภาชนะ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี คือจำนวนตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตต่อภาชนะได้แก่ 100, 150, 200 และ 250 ตัว/กล่อง

ใส่มวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนวัย 2 จำนวนต่างๆ/กล่อง ตามกรรมวิธี ๆละ 5 กล่อง เลี้ยงด้วยหนอนนกจนมวนเป็นตัวเต็มวัย

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนตัวอ่อนของมวนเพชฌฆาตที่รอดชีวิตเป็นตัวเต็มวัย

2.2 จำนวนที่เหมาะสมของมวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยที่ผลิตขยายต่อภาชนะ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือจำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้ต่อเพศเมียของมวนเพชฌฆาตต่อภาชนะได้แก่ 20:20, 25:25, 30:30, 40:40 และ 50:50 คู่/กล่อง

ใส่มวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยจำนวนต่างๆ/กล่อง ตามกรรมวิธี ๆ ละ 5 กล่อง เลี้ยงด้วยหนอนนกจนตัวเต็มวัยตาย

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนไข่ของมวนเพชฌฆาตผลิตได้ในแต่ละซ้ำ

3. การเก็บรักษามวนเพชฌฆาต *S. versicolor* และเหยื่ออาหาร (ดักแด้หนอนนก) ของมวนเพชฌฆาต (ปี 2556)

เพื่อชะลอการลอกคราบของมวนเพชฌฆาตสำหรับการนำไปปล่อยควบคุมศัตรูพืช และเพื่อยืดอายุดักแด้หนอนนกสำหรับการนำไปเลี้ยงมวนเพชฌฆาต มี 2 หัวข้อ คือ

3.1 การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.1 การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือระยะเวลาในการเก็บตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส นาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

ใส่มวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนวัย 4 จำนวน 10 ตัว/กล่อง ในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยใส่มวนเพชฌฆาต 5 กล่อง/ระยะเวลา ดังนั้นใน 4 ระยะเวลาใช้ดักแด้หนอนนกทั้งหมด 25 กล่อง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนมวนเพชฌฆาตที่รอดชีวิต

3.1.2 การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13.73 $\pm$ 0.29 องศาเซลเซียส

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี คือระยะเวลาในการเก็บตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13.73 $\pm$ 0.29 องศาเซลเซียส นาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

ใส่มวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนวัย 4 จำนวน 10 ตัว/กล่อง ในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยใส่มวนเพชฌฆาต 5 กล่อง/ระยะเวลา

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนมวนเพชฌฆาตที่รอดชีวิต

3.2 การเก็บรักษาเหยื่ออาหาร (ดักแด้หนอนนก) ของมวนเพชฌฆาต ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

ดำเนินการทดลองแบบ 5 x 5 factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 2 factor โดย factor A ได้แก่ อายุดักแด้ มี 5 ระดับ คือ 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน และ factor B ได้แก่ ระยะเวลาในการเก็บดักแด้หนอนนกในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส มี 5 ระดับคือ 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

ใส่ดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 2, 3, 4, 5 และ 6 วัน จำนวน 10 ดักแด้/กล่อง/อายุ อายุละ 25 กล่อง นำกล่องหนอนนกที่มีอายุต่างๆนี้ใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยใส่ดักแด้หนอนนก 5 กล่อง/อายุ/ระยะเวลา ดังนั้นใน 4 ระยะเวลาจะใช้ดักแด้หนอนนก 25 กล่อง/1 อายุ

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนดักแด้หนอนนกที่รอดชีวิต และสมบรูณ์

4. ต้นทุนการผลิตมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* Dohrn (ปี 2557)

การศึกษาต้นทุนการผลิตมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* Dohrn. ดำเนินการศึกษากับมวน 3 ระยะคือ

4.1 ระยะตัวอ่อน

นำมวนเพชฌฆาตระยะไข่จาก stock culture ในห้องปฏิบัติการ ใส่ในกล่องพลาสติก จำนวน 3 กลุ่ม/กล่อง จำนวน 10 กล่อง หลังจากนั้นประมาณ 15 วัน ไข่มวนจะฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ในแต่ละกล่องนำมวนออกให้เหลือจำนวน 150 ตัว/กล่อง ระยะตัวอ่อนวัย 1-2 เลี้ยงด้วยดักแด้หนอนนก ระยะตัวอ่อนวัย 3 – 5 ใส่อาหารและเก็บหนอนนกที่ถูกกิน 2 ครั้ง/สัปดาห์ และเปลี่ยนกล่องที่เลี้ยง 1 ครั้ง/สัปดาห์ จนมวนเป็นตัวเต็มวัย

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนดักแด้หนอนนกและหนอนนกที่ถูกมวนระยะตัวอ่อนกิน เพื่อนำมาหาต้นทุนการผลิตมวนระยะตัวอ่อนจำนวน 150 ตัว/กล่อง

4.2 ระยะตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยตาย

ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1 แต่ยังคงเลี้ยงมวนต่อไปจนมวนตัวเต็มวัยตาย โดยเลี้ยงมวนตัวเต็มวัยเลี้ยงด้วยหนอนนก ใส่อาหารและเก็บหนอนนกที่ถูกกิน 2 ครั้ง/สัปดาห์ และเปลี่ยนกล่องที่เลี้ยง 1 ครั้ง/สัปดาห์ จนมวนตัวเต็มวัยตาย

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนดักแด้หนอนนกและหนอนนกที่ถูกมวนระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัยกิน เพื่อนำมาหาต้นทุนการผลิตมวนระยะตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัย จากจำนวนมวนระยะตัวอ่อนเริ่มต้น 150 ตัว/กล่อง จนถึงตัวเต็มวัยตาย

4.3 ระยะตัวเต็มวัย

นำมวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยจาก stock culture ในห้องปฏิบัติการ ใส่ในกล่องพลาสติก จำนวนเพศผู้ต่อเพศเมีย 40 ต่อ 40 ตัว/กล่อง จำนวน 10 กล่อง เลี้ยงด้วยหนอนนก ใส่อาหารและเก็บหนอนนกที่ถูกกิน 2 ครั้ง/สัปดาห์ และเปลี่ยนกล่องที่เลี้ยง 1 ครั้ง/สัปดาห์ จนมวนตัวเต็มวัยตาย

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนหนอนนกที่ถูกมวนระยะตัวเต็มวัยกิน เพื่อนำมาหาต้นทุนการผลิตมวนระยะตัวเต็มวัย จากจำนวนมวนระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ต่อเพศเมีย 40 ต่อ 40 ตัว จนถึงตัวเต็มวัยตาย

- **เวลาและสถานที่**

เริ่มต้น 2554 สิ้นสุด 2557

ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2.2 พัฒนาการเพาะเลี้ยงและศักยภาพการเป็นตัวห้ำของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis* sp. (Lepidoptera:Lycaenidae)

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์
  - กล่องใส่ตัวอย่างแมลง
  - ฟักทอง ใช้เลี้ยงเพลี้ยแป้ง
  - ผ้าขาวบาง กรรไกร น้ำผึ้ง ยางรัด
  - กรงเลี้ยงแมลง
  - กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 5 x 10 x 5 ซม.
- วิธีการ วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งงานวิจัย เป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่
  1) สำรวจชนิดและปริมาณ ผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* (Westwood)
  2) ศึกษาชีววิทยาและวิธีการเพาะเลี้ยงผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* (Westwood)

ขั้นตอนที่ 1 สำรวจชนิดและปริมาณ ผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* (Westwood)

ทำการสำรวจพื้นที่ปลูกพืชที่มีการระบาดของเพลี้ยแป้ง เก็บตัวอย่างของผีเสื้อตัวห้ำทุกระยะที่พบนำกลับมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

การบันทึกข้อมูล บันทึกชนิดของผีเสื้อตัวห้ำ ปริมาณที่พบในแต่ละเดือน สถานที่ พืชอาศัย

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาชีววิทยาและวิธีการเพาะเลี้ยงผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* (Westwood)

เก็บรวบรวมผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* จากแปลงปลูกพืชที่มีการระบาดของเพลี้ยแป้ง นำผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* ทุกระยะมาเลี้ยงในกรงเลี้ยงแมลงขนาด กว้าง x ยาว x สูง 100 x 100 x 150 ซม. ภายในกรงให้เพลี้ยแป้งที่อยู่บนฟักทองเป็นอาหาร เมื่อตัวเต็มวัยวางไข่บนผลฟักทอง แยกออกมาเก็บไว้ในกล่องขนาด กว้าง x ยาว x สูง 5 x 10 x 5 ซม. ปิดฝาด้วยผ้าขาวบาง เมื่อตัวอ่อนวัย 1 ฟักออกมา แยกไปเลี้ยงในกล่องใหม่ ให้เพลี้ยแป้งเป็นอาหารทุกวัน บันทึกการเจริญเติบโต และพฤติกรรมจนครบวงจรชีวิต การบันทึกข้อมูล บันทึกระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ ตลอดวงจรชีวิต

- เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2556
  ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

การทดลองที่ 1.2.3 ชนิดและศักยภาพการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ*Stethorus* spp.ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชบนมันสำปะหลัง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลงและไร เช่น พู่กัน ถุงกระดาษ
- อุปกรณ์เลี้ยงแมลงและไร เช่น กล่องพลาสติก สำลี
- กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา
- อุปกรณ์บันทึกข้อมูล กล้องถ่ายรูป

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงเต่าตัวห้ำและไรศัตรูพืชจากแปลงมันสำปะหลัง

1. เก็บตัวอย่างด้วงเต่าตัวห้ำและไรศัตรูพืชที่พบด้วงเต่าตัวห้ำลงทำลายจากแปลงมันสำปะหลัง โดยตัดส่วนของพืชที่พบด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp. และไรใส่ถุงกระดาษ แล้วใส่ถุงพลาสติกมัดให้แน่น ใส่ในถังเก็บความเย็น

2. ตรวจสอบจำแนกชนิดของด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp. ตัวเต็มวัย โดยจำแนกจากลักษณะของอวัยวะเพศผู้ ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ 2 ส่วนคือ siphon และ tegmen ด้วงเต่าแต่ละชนิดมีรูปร่างและลักษณะของอวัยวะเพศผู้ที่แตกต่างกัน จึงเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดด้วงเต่า สำหรับตัวหนอนและดักแด้ของด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp. นำมาเลี้ยงให้เป็นตัวเต็มวัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกินต่อไป

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกสถานที่ พิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง รวมทั้งชื่อผู้เก็บ

ขั้นตอนที่2.การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินไรศัตรูพืชชนิดต่างๆ แบ่งเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

1 การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินระยะไข่ของไรศัตรูพืชชนิดต่างๆ วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 20 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

1. ไรแดงหม่อน *T. truncatus*ระยะไข่
2. ไรแมงมุมคันซาวา*T. kanzawai* ระยะไข่
3. ไรแดงแอฟริกัน *E. africanus* ระยะไข่

4. ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*ระยะไข่

นำไข่ไรศัตรูพืชจำนวน 200 ฟอง ของไรศัตรูพืชทั้ง 4 ชนิด(Figure 1)ใส่ลงบนใบพืชอาหารของไรชนิดนั้นๆที่มีขนาด 2×2 เซนติเมตร แล้วใส่ลงกล่องพลาสติกขนาด 5.5×7.5×3 เซนติเมตร ปล่อยตัวเต็มวัยด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus* ที่มีอายุประมาณ 2 วัน ลงในกล่องกล่องละ 1 ตัว ทิ้งไว้ให้กินไข่ของไรศัตรูพืชนาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 20 ซ้ำ

2 การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินระยะตัวอ่อนของไรศัตรูพืชชนิดต่างๆ วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 20 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

1. ไรแดงหม่อน *T. truncatus*ระยะตัวอ่อน
2. ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*ระยะตัวอ่อน
3. ไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*ระยะตัวอ่อน
4. ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*ระยะตัวอ่อน

นำตัวอ่อนไรศัตรูพืชจำนวน 100 ตัว ของไรศัตรูพืชทั้ง 4 ชนิด(Figure 2)ใส่ลงบนใบพืชอาหารของไรชนิดนั้นๆที่มีขนาด 2×2 เซนติเมตร แล้วใส่ลงกล่องพลาสติกขนาด 5.5×7.5×3 เซนติเมตร ปล่อยตัวเต็มวัยด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus*ที่มีอายุประมาณ 2 วัน ลงในกล่อง กล่องละ 1 ตัว ทิ้งไว้ให้กินตัวอ่อนของไรศัตรูพืชนาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 20 ซ้ำ

3 การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินระยะตัวเต็มวัยของไรศัตรูพืชชนิดต่างๆ วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 20 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

1. ไรแดงหม่อน *T. truncatus*ระยะตัวเต็มวัย
2. ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*ระยะตัวเต็มวัย
3. ไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*ระยะตัวเต็มวัย
4. ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*ระยะตัวเต็มวัย

นำตัวเต็มวัยไรศัตรูพืชจำนวน 100 ตัว ของไรศัตรูพืชทั้ง 4 ชนิด(Figure 3)ใส่ลงบนใบพืชอาหารของไรชนิดนั้นๆที่มีขนาด 2×2 เซนติเมตร แล้วใส่ลงกล่องพลาสติกขนาด 5.5×7.5×3 เซนติเมตร ปล่อยตัวเต็มวัยด้วงเต่าตัวห้ำ *S.pauperculus*ที่มีอายุประมาณ 2 วัน ลงในกล่อง กล่องละ 1 ตัว ทิ้งไว้ให้กินตัวเต็มวัยของไรศัตรูพืชนาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 20 ซ้ำ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนไข่ ระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของไรศัตรูพืชที่ถูกด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus*กินแล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยวิธี Analysis of Variance เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2557 สิ้นสุด กันยายน 2558

-แปลงมันสำปะหลัง จังหวัดกำแพงเพชร พิจิตร ตาก กรุงเทพฯ กาญจนบุรี ระยอง สุพรรณบุรี อ่างทอง ชัยนาท บุรีรัมย์ นครราชสีมา ลพบุรี สระบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว ขอนแก่น และอุดรธานี

-ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 1.2.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของระยะไข่ และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider (Neuroptera:Chrysopidae)

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ - แมลงช้างปีกใส *P. ramburi*
  - ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
  - กล่องขนาด 35×45×12 เซนติเมตร
  - กล่องขนาด 18×26×10 เซนติเมตร
  - กล่องขนาด 6 x 10 x 5 เซนติเมตร
  - กระดาษเอนกประสงค์
  - น้ำผึ้ง +ยีสต์
- วิธีการ มี 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi*

1.1 เลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงแมลงช้างปีกใส

เก็บรวบรวมเพลี้ยแป้ง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆมาเลี้ยงบนผลฟักทอง โดยใช้ฟักทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-25 เซนติเมตร ใส่ในกล่องขนาด 35×45×12 เซนติเมตร จำนวน 4 -5 ลูกต่อกล่อง รองพื้นกล่องด้วยกระดาษเพื่อซับความชื้น เขี่ยเพลี้ยแป้งประมาณ 20 -30 ตัว ลงบนฟักทองแต่ละลูก ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบางรัดด้วยยางยืดทิ้งไว้ประมาณ 20-25 วัน เมื่อได้เพลี้ยแป้งทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อนอยู่บนผลฟักทองสำหรับนำไปใช้เลี้ยงตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใสต่อไป

1.2 เลี้ยงขยายแมลงช้างปีกใส *P. ramburi*

เก็บแมลงช้างปีกใสทุกระยะจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัย นำแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ 40 ตัว เพศเมีย 60ตัวใส่กล่องสี่เหลี่ยมขนาด 18×26×10 เซนติเมตร ที่รองพื้นกล่องแล้วด้วยกระดาษ ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบาง ภายในกล่องวางน้ำผึ้งผสมยีสต์บนกระดาษไข เพื่อเป็นอาหารของแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัย วางแผ่นสำลีชุ่มน้ำไว้ด้านบนผ้าขาวบางเพื่อให้ความชื้นแก่ตัวเต็มวัย เปลี่ยนกล่องตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสทุกๆ 3 วัน เนื่องจากตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสจะวางไข่ไว้ในกล่อง ต่อจากนั้นนำฟักทองที่มีเพลี้ยแป้งจากขั้นตอนที่1 ใส่ในกล่องที่มีไข่ของแมลงช้างปีกใสเพื่อเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส โรยกระดาษทิชชูที่ตัดเป็นริ้วๆลงในกล่อง ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบางวางไว้ประมาณ 15-20 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนเจริญเติบโต จนกระทั่งเข้าดักแด้ จากนั้นเก็บดักแด้ เพื่อให้ฟักเป็นตัวเต็มวัยต่อไป วิธีการเพิ่มประชากรแมลงช้างปีกใส ทำโดยนำแมลงช้างปีกใสที่เปลี่ยนจากกล่องเดิมนำไปเลี้ยงในกล่องใหม่มีวิธีการทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ในการทดลองนี้ใช้ระยะไข่ และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีกใส ในรุ่น F2

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการฟักไข่ และการฟักเป็นตัวเต็มวัยของดักแด้แมลงช้างปีกใส

ทำการทดลองในอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ 0±2 10±2 และ 15 ± 2 องศาเซลเซียส ในแต่ละอุณหภูมิทำการทดสอบการเก็บรักษาไข่ และดักแด้แมลงช้างปีกใส ที่ระยะเวลา 5, 10, และ15 วัน

2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการฟักของไข่แมลงช้างปีกใส *P. ramburi*

นำไข่ของแมลงช้างปีกใส ซึ่งเป็นไข่ที่วางภายในวันเดียวกัน อายุ 1 วัน ใส่ในกล่องขนาด กว้างx ยาวxสูง เท่ากับ 6 x 10 x 5 ซม. จำนวน 12 กล่องกล่องละ 100 ฟอง แบ่งกล่องไข่แมลงช้างปีกใสออกเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 3 กล่องส่วนที่ 1 เก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 เก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 10±2 องศาเซลเซียส และส่วนที่ 3 เก็บที่อุณหภูมิ 15 ± 2 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 4 เก็บอุณหภูมิห้อง ปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการเก็บที่ 5, 10, และ15 วัน

การบันทึกผล หลังจากเก็บรักษาไข่ในระยะเวลาที่กำหนดนำไข่ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกอัตราการฟักออกเป็นตัวอ่อน ระยะเวลาในการฟักโดยใช้เวลาสังเกตการฟักของทุกกล่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต่อจากนั้นศึกษาวงจรชีวิตตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนกระทั้งเป็นตัวเต็มวัย เปรียบเทียบกับแมลงช้างปีกใสที่เลี้ยงในอุณหภูมิห้องปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการออกเป็นตัวเต็มวัยของดักแด้แมลงช้างปีกใส *P. ramburi*

นำดักแด้ของแมลงช้างปีกใส ซึ่งเป็นดักแด้ภายในวันเดียวกัน อายุ 1 วัน ใส่ในกล่องขนาด กว้างx ยาวx สูง เท่ากับ 6 x 10 x 5 ซม. จำนวน 12 กล่องกล่อง ละ 100 ดักแด้ แบ่งกล่องดักแด้แมลงช้างปีกใสออกเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 3 กล่อง ส่วนที่ 1 เก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 0±2 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 เก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 10±2 องศาเซลเซียส และส่วนที่ 3 เก็บที่อุณหภูมิ 15 ±2 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 4 เก็บอุณหถูมิห้อง ปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการเก็บที่ 5, 10, และ15 วัน

การบันทึกผล หลังจากเก็บรักษาดักแด้แมลงช้างปีกใสในระยะเวลาที่กำหนดนำดักแด้ออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกอัตราการรอดเป็นตัวเต็มวัยเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ในทุกกล่อง ระยะเวลาในการออกมาจากดักแด้ อัตราส่วนเพศผู้: เพศเมีย จำนวนไข่ที่ได้ และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ในรุ่นต่อไป เปรียบเทียบกับแมลงช้างปีกใสที่เลี้ยงในอุณหภูมิปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียส

- **เวลาและสถานที่** ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558
  ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

การทดลองที่ 1.2.5 ผลของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* ต่อแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider ระยะต่างๆ

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์ แมลงช้างปีกใส *P. ramburi*
  ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae*
  เชื้อราขาว *B. bassiana*
  กล่องขนาด 35×45×12 เซนติเมตร
  กล่องขนาด 18×26×10 เซนติเมตร
  กล้องจุลทรรศน์
  กระดาษเอนกประสงค์
  น้ำผึ้ง
  ยีสต์
- **วิธีการ** ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏ และสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เดือนตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

วิธีการมี 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi*

1.1 เลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งเพื่อเป็นอาหารเลี้ยงแมลงช้างปีกใส เก็บรวบรวมเพลี้ยแป้ง จากแหล่งปลูกพืชต่างๆมาเลี้ยงบนผลฟักทอง โดยใช้ฟักทองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-25 เซนติเมตร ใส่ในกล่องขนาด 35×45×12 เซนติเมตรจำนวน 4 -5 ลูกต่อกล่อง รองพื้นกล่องด้วยกระดาษเพื่อซับความชื้น เขี่ยเพลี้ยแป้งประมาณ 20 -30 ตัว ลงบนฟักทองแต่ละลูก ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบางรัดด้วยยางยืดทิ้งไว้

ปรมาณ 20-25 วัน เมื่อได้เพลี้ยแป้งทั้งตัวเต็มวัยและตัวอ่อนอยู่บนผลฟักทองสำหรับนำไปใช้เลี้ยงตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใสต่อไป

1.2 เลี้ยงขยายแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* เก็บแมลงช้างปีกใสทุกระยะจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยนำแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัยเพศผู้40 ตัว เพศเมีย 60ตัวใส่กล่องสี่เหลี่ยมขนาด 18×26×10 เซนติเมตร ที่รองพื้นกล่องแล้วด้วยกระดาษ ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบาง ภายในกล่องวางน้ำผึ้งผสมยีสต์บนกระดาษไข เพื่อเป็นอาหารของแมลงช้างปีกใสระยะตัวเต็มวัย วางแผ่นสำลีชุ่มน้ำไว้ด้านบนผ้าขาวบางเพื่อให้ความชื้นแก่ตัวเต็มวัย เปลี่ยนกล่องตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสทุกๆ 3 วัน เนื่องจากตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใสจะวางไข่ไว้ในกล่อง ต่อจากนั้นนำฟักทองที่มีเพลี้ยแป้งจากขั้นตอนที่1 ใส่ในกล่องที่มีไข่ของแมลงช้างปีกใสเพื่อเลี้ยงตัวอ่อนแมลงช้างปีกใสโรยกระดาษทิชชูที่ตัดเป็นริ้วๆลงในกล่อง ปิดกล่องด้วยผ้าขาวบาง วางไว้ประมาณ 15-20 วัน เพื่อให้ตัวอ่อนเจริญเติบโต จนกระทั่งเข้าดักแด้ จากนั้นเก็บดักแด้ เพื่อให้ฟักเป็นตัวเต็มวัยต่อไป วิธีการเพิ่มประชากรแมลงช้างปีกใส ทำโดยนำแมลงช้างปีกใสที่ เปลี่ยนจากกล่องเดิม นำไปเลี้ยงในกล่องใหม่มีวิธีการทำเช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น ในการทดลองนี้ใช้ระยะไข่ และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีกใส ในรุ่น F2

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาผลของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* ต่อแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi*

2.1 ผลของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ต่อแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* นำไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงช้างปีกใส อย่างละ 100 ตัว ใส่ในกล่องพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ฝากล่องเจาะเป็นรูเล็กๆระบายอากาศ ก่อนใส่ตัวอย่างแมลงช้างปีกใส สเปรย์กล่องด้วยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงชนิด*Steinernema carpocapsae* ในอัตรา 200 ตัวต่อน้ำ 1 มล. ที่ใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ในกล่องที่มีตัวอ่อนให้ใส่เพลี้ยแป้งเป็นอาหารตัวอ่อน และกล่องที่มีตัวเต็มวัยใส่น้ำผึ้งผสมยีสต์เลี้ยงตัวเต็มวัยตามปกติ ทำการทดลอง 3 ซ้ำซ้ำละ 100 ตัวอย่าง

บันทึกผลอัตราการตาย และ การรอดจน ครบวงจรชีวิตของแมลงช้างปีกใส

2.2 ผลของเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* ต่อแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* นำไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยของแมลงช้างปีกใสอย่างละ 100 ตัว ใส่ในกล่องพลาสติกเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 8 เซนติเมตร ฝากล่อง เจาะเป็นรูเล็กๆระบายอากาศ แต่ละระยะของแมลงช้างปีกใส ก่อนใส่ตัวอย่างแมลงช้างปีกใส สเปรย์กล่องด้วยเชื้อรา *Beauveria bassiana* ในอัตรา 1 x 10^9 cfu ต่อ มล. ที่ใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ให้เพลี้ยแป้งเลี้ยงตัวอ่อนและ น้ำผึ้งผสมยีสต์เลี้ยงตัวเต็มวัยตามปกติ บันทึกผลอัตราการตาย และการรอดจนครบวงจรชีวิตของแมลงช้างปีกใส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ละ 50 ตัว

การบันทึกผล บันทึกผลอัตราการตาย และการรอดจน ครบวงจรชีวิตของแมลงช้างปีกใส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ตัว

- เวลา และสถานที่ ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558
  ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Result and Discussion)

กิจกรรมย่อย 1.1 การควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี

การทดลองที่ 1.1 เทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้แตนเบียนสกุล *Encarsia* เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว

ผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บรวบรวมแมลงหวี่ขาวจากแปลงปลูกมันสำปะหลัง และจากวัชพืชบริเวณรอบแปลง และต้นฝรั่ง พริก และกล้วย ที่อำเภอเมือง และศรีราชา จังหวัดชลบุรี และอำเภอปากช่องและสีคิ้ว จังหวัดนครราชสีมา นำแมลงหวี่ขาวที่พบมาตรวจสอบแตนเบียนในห้องปฏิบัติการ และศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยา และศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล *Encarsia* ผลการทดลองพบว่า

1. สำรวจและเก็บรวบรวมแมลงหวี่ขาว และแตนเบียนสกุล *Encarsia* จากสภาพแปลง

<u>ชนิดของแมลงหวี่ขาว</u>

จากการเก็บตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่พบบนมันสำปะหลังมาจำแนกในห้องปฏิบัติการ พบแมลงหวี่ขาว 2 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus disperses* Russell และแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) สอดคล้องกับ สุนัดดา และคณะ (2556) ที่รายงานพบแมลงหวี่ขาว 2 ชนิดนี้ ในแปลงปลูกมันสาปะหลังทั่วทุกภาคของประเทศไทย

<u>ชนิดของแตนเบียน</u>

จากการเก็บตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว *A. disperses* จากแปลงปลูกมันสำปะหลังมาแยกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ และตรวจสอบการลงทำลายของแตนเบียนแตนเบียนสกุล *Encarsia* พบแตนเบียนออกจากตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว เป็นแตนเบียนสกุล *Encarsia* จำนวน 2 ชนิด ดังเช่นที่พบมา ตั้งแต่ปี 2554-2556 ชนิดที่ 1 มีลักษณะลำตัวสีน้ำตาลดำ scutellum มีสีเหลือง หนวดเป็นปล้องสีเหลือง ปีกคู่หน้าเป็นแผ่นใสมีแถบสีน้ำตาลบริเวณเส้นปีกใกล้ฐานปีก ขาสีเหลืองยกเว้น coxa และ femur ขาหลังมีสีน้ำตาล (Figure 1) และชนิดที่ 2 มีลักษณะสีเหลืองส้มทั้งตัว ปีกคู่หน้าเป็นแผ่นใส (Figure 2) ซึ่งผลการทดลองนี้พบว่าสอดคล้องกับ Obinin *et al*. (2004) ซึ่งรายงานเกี่ยวกับแตนเบียนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวในประเทศเบนินว่ามีการสำรวจพบแตนเบียน 2 ชนิด ได้แก่ *Encarsia guadeloupae* Viggiani และ *Encarsia dispersa* Polaszek (=*Encarsia ?haitiensis* Dozier) ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายคลึงกันกับที่พบจากการทดลองนี้ นอกจากนี้ Chien *et al*. (2000) รายงานว่า ในไต้หวันได้มีการนำเข้าแตนเบียน 2 ชนิด ดังกล่าวข้างต้น จากรัฐฮาวาย สหรัฐอเมริกา เพื่อนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวใยเกลียวโดยชีววิธีแบบคลาสสิก งานวิจัยนี้ได้เลือกแมลงหวี่ขาวใยเกลียวซึ่งพบได้มากในแปลงมันสำปะหลัง และพบแตนเบียนสกุล *Encarsia* จำนวนอย่างน้อย 2 ชนิด มาทำการศึกษาต่อไป

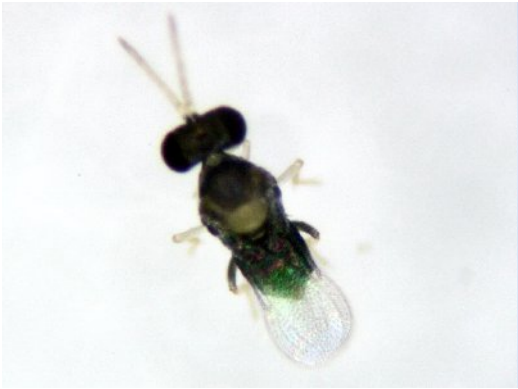


Figure 1 *Encarsia* sp.1 (black)

Figure 2 *Encarsia* sp.2 (yellow)

2. ศึกษาอัตราการเบียนและสัดส่วนชนิดของแตนเบียนสกุล *Encarsia* ที่พบในสภาพแปลงมันสำปะหลัง

อัตราการเบียนของแตนเบียนสกุล Encarsia ที่พบในสภาพแปลงมันสำปะหลัง

จากการศึกษา โดยนำตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่เก็บจากแปลงมันสำปะหลังมาแยกใส่หลอดพลาสติก เพื่อตรวจสอบแตนเบียน และศึกษาอัตราการเบียนในห้องปฏิบัติการ นำมาแยกแต่ละวัยแล้วเลี้ยงในกล่องพลาสติก ตรวจผลอัตราการเบียนของแตนเบียนสกุล Encarsia

นำตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่เก็บจากแปลงมันสำปะหลังมาแยกแต่ละวัย แล้วเลี้ยงในกล่องพลาสติก และตรวจผลอัตราการเบียนของแตนเบียนสกุล Encarsia พบว่า เฉพาะตัวอ่อนแมลงหวี่ขาววัยที่ 3 ที่พบแตนเบียนออกมา ส่วนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาววัย 1 และ 2 ไม่พบการเบียน ซึ่งสอดคล้องกับ Weeden and Hoffman (2009) ซึ่งรายงานว่า E. formosa จะเข้าทำลายแมลงหวี่ขาว โดยชอบวางไข่ตัวอ่อนวัย 3 วัย 4 prepupa และดักแด้ ในปี 2554 มีอัตราการเบียน 8.01-44.88% ในปี 2555 พบว่ามีอัตราการเบียน 1.58-44.44% ในปี 2556 พบว่า มีอัตราการเบียน 0-57.14% โดยพบมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม (Table 1A) ส่วนในปี 2557 มีอัตราการเบียน 0-77.42% (Table 1B) ซึ่งเป็นอัตราการเบียนที่มากกว่าในปี 2554 2555 และ 2556 ที่มีอัตราการเบียนใกล้เคียงกันที่ 8.01-44.88% 1.58-44.44% และ 0-57.14% ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 ปี มีอัตราการเบียนใกล้เคียงกับ Mani and Krishnamoothy (2006) ที่รายงานว่า Encarsia guadeloupae มีอัตราการเบียน 3.43–32.94% ทั้งนี้อาจเนื่องจากในปี 2557 พบการระบาดของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวน้อย

สัดส่วนชนิดของแตนเบียนสกุล Encarsia ที่พบในสภาพแปลงมันสำปะหลัง

จาก Table 2 แสดงสัดส่วนชนิดของแตนเบียนสกุล Encarsia ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 สีดำ และชนิดที่ 2 สีเหลือง พบว่า ในปี 2556 ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2556 แตนเบียนที่ออกมาในช่วงหน้าแล้งเดือน มีนาคมถึงพฤษภาคม พบว่าทั้งหมดเป็นแตนเบียนชนิดสีเหลือง แต่จากเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน พบแตนเบียนทั้งชนิดสีเหลืองและสีดำ โดยมีสัดส่วน ชนิดสีเหลือง : สีดำ เท่ากับ 90.0 : 10.0, 94.44 : 5.56, 73.91 : 26.09 และ 90.32 : 9.68 ตามลำดับ (Table 2A) ส่วนการทดลองในปี 2557 สัดส่วนของแตนเบียนสกุล Encarsia ทั้ง 2 ชนิด ที่พบตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 ส่วนใหญ่แตนเบียนที่ออกมาเป็นชนิดสีเหลือง ซึ่งพบได้เกือบทั้งปี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงหน้าแล้งเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม พบว่าทั้งหมดเป็นแตนเบียนชนิดสีเหลือง ส่วนชนิดสีดำพบได้ในเดือนตุลาคม พฤศจิกายน และมกราคม แต่จากเดือนกุมภาพันธ์ถึงสิงหาคมไม่พบแตนเบียนชนิดสีดำ ต่อมาพบอีกครั้งในเดือนกันยายน (Table 2B)

3. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล Encarsia ในห้องปฏิบัติการ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเพื่อใช้เพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล Encarsia

ทำการศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว แบ่งเป็น 4 งาน ได้แก่

3.1.1 วงจรชีวิตของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว (Figure 3)

ในห้องปฏิบัติการ ทำการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นมันสำปะหลัง เพื่อศึกษาวงจรชีวิตและพฤติกรรม โดยนำตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวใยเกลียวมาใส่ในกรงขนาด 40 x 40 x 60 เซนติเมตร และใส่ต้นมันสำปะหลังที่ปลูกในกระถางเพื่อให้ตัวเต็มวัยวางไข่ พบว่า แมลงหวี่ขาวใยเกลียวมีวงจรชีวิตจากไข่จนออกเป็นตัวเต็มวัยใช้ระยะเวลา 24-28 วัน จากการศึกษา พบว่า ระยะไข่มีอายุ 3-4 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 1-3 มีอายุ 3, 5-7 และ 6-7 วัน ตามลำดับ และดักแด้ (หรือบางตำราเรียกตัวอ่อนวัยที่ 4) มีอายุ 7-9 วัน

ในสภาพโรงเรือนทดลอง ศึกษาวงจรชีวิตแมลงหวี่ขาวบนต้นมันสำปะหลังที่ปลูกในกระถางตั้งไว้กลางแจ้ง บันทึกภาพทุกวัน พบว่า มีวงจรชีวิต 24-35 วัน เฉลี่ย 27.60 วัน มีระยะไข่มีอายุ 5-6 วัน เฉลี่ย 5.50 วัน ตัวอ่อนวัยที่ 1-3 มีอายุ 4-8, 3-10 และ 3-8 วัน ตามลำดับ เฉลี่ย 5.13, 4.62 และ 5.15 วัน ตามลำดับ และดักแด้มีอายุ 4-9 วัน และ เฉลี่ย 7.10 วัน ผลการศึกษาแตกต่างจากในห้องปฏิบัติการบ้างเล็กน้อย และมีวงจรชีวิตยาวนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Palaniswami et al. (1995) ซึ่งรายงานว่าใช้เวลา 18-23 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากชนิดพืชอาหารและอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไป ในปี 2556 ได้ทำการศึกษาวงจรชีวิตของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นฝรั่งเบื้องต้นพบว่า มีวงจรชีวิต 24-32 วัน ไม่แตกต่างจากที่เลี้ยงบนต้นมันสำปะหลัง

3.1.2 พฤติกรรมของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

จากการศึกษาพฤติกรรมของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นมันสำปะหลัง พบว่า ตัวเต็มวัยวางไข่สีขาวขุ่นต่อมาจะกลายเป็นสีเหลืองขนาดเล็กประมาณ 0.3 มิลลิเมตร มีใยสีขาวปกคลุมวางเรียงเป็นวงคดเคี้ยวรูปร่าง

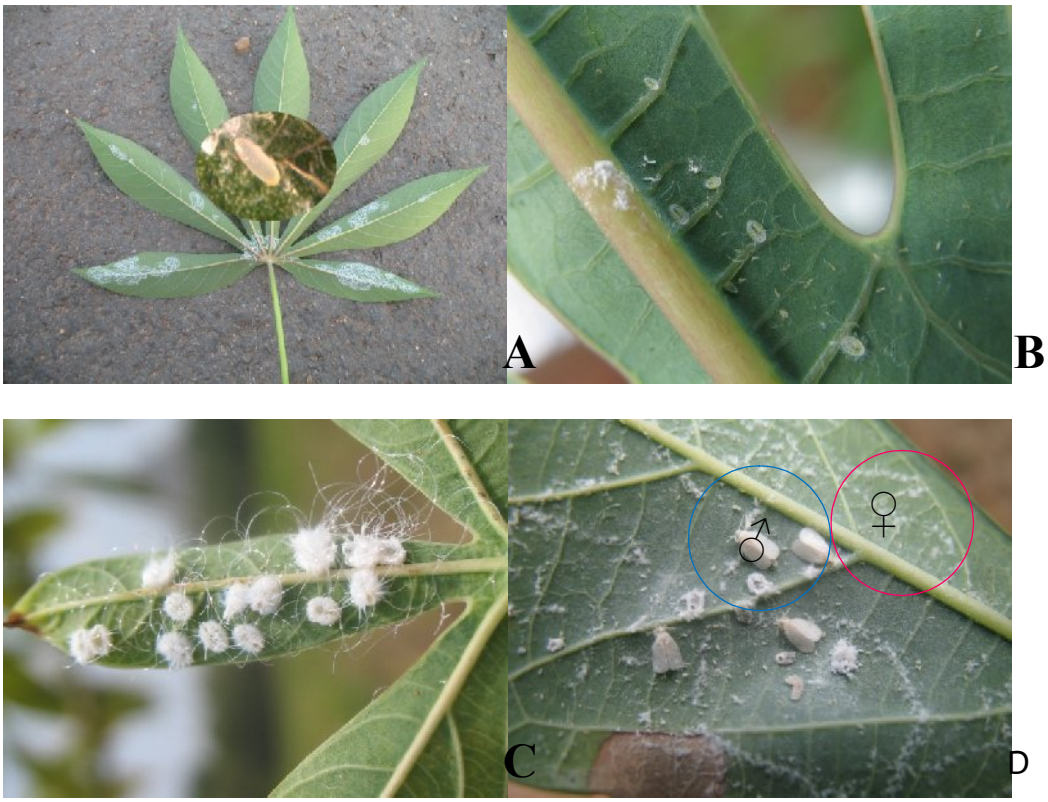


Figure 3 Life cycle of spiraling whitefly; *Aleurodicus dispersus* Russell
A) eggs B) nymphs C) pupa D) adults

ไม่แน่นอนไว้ที่ใต้ใบมันสำปะหลัง ตัวอ่อนวัยที่ 1 ที่เพิ่งฟักออกจากไข่มีขนาดใกล้เคียงกับไข่เดินไปมาบนใบมันสำปะหลัง และเกาะดูดกินน้ำเลี้ยงจากใบพืช เมื่อลอกคราบเป็นวัยที่ 2 ไม่ค่อยเคลื่อนที่ ลำตัวจะค่อย ๆ แบนลง และเกาะอยู่กับที่ เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวรอบ ๆ ตัว ตัวอ่อนวัยที่ 3 จะสร้างไขสีขาวบนลำตัวเพิ่มขึ้น ตัวอ่อนชอบดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณเส้นใบ (Figure 4) และลอกคราบเข้าดักแด้บนใบมันสำปะหลังซึ่งจะมีเส้นใยสีขาวโค้งงอรอบ ๆ ตัว และเส้นใยสีขาวยาวปกคลุมอยู่ทั่วตัวดักแด้เห็นได้ชัดเจน และออกเป็นตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยชอบเกาะดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่บริเวณเส้นใบ (Figure 5) ตัวเต็มวัยเมื่อออกจากดักแด้จะเกาะอยู่บนใบนั้นระยะหนึ่ง แล้วจึงเริ่มจับคู่ผสมพันธุ์หาที่วางไข่ต่อไป โดยจะตัวเมียจะชอบวางไข่บนใบอ่อนที่อยู่ถัดขึ้นไป

ด้านบนบริเวณใกล้ยอดมันสำปะหลัง เพศเมียชอบวางไข่บนใบมันสำปะหลังที่ไม่อ่อนไม่แก่ แต่หากมีการระบาดมากจะมีการวางไข่บนใบที่ถัดจากใบยอดลงมาด้วย และตัวเต็มวัยจะเกาะนิ่งอยู่บนใบมันสำปะหลังในขณะที่มีลมพัดแรง แต่ถ้าไม่มีลมพัดเมื่อใบถูกกระทบจะมีการบินให้เห็นได้ ตัวเต็มวัยจะมีการบินให้เห็นได้ในเวลาเย็น ในช่วงเวลากลางวันที่อากาศร้อน จะไม่ค่อยพบตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวบิน ถึงแม้จะใบมันสำปะหลังที่มีแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเกาะอยู่จะถูกรบกวน

Figure 4 spiraling whitefly nymphs feeding at the vein of leaf

Figure 5 spiraling whitefly adults feeding at the vein of leaf

3.1.3 การเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

จากการสำรวจ และเก็บรวบรวมแมลงหวี่ขาวใยเกลียวจากแปลงปลูกมันสำปะหลัง ต้นฝรั่ง พริก และต้นกล้วย ในปี 2556 พบแมลงหวี่ขาวมีการระบาดรุนแรงในแปลงมันสำปะหลังที่บริเวณเนินเขา อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ในเดือน ตุลาคม และพฤศจิกายน และเริ่มลดลงในเดือน ธันวาคม จนถึงมีนาคม (ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิต) พบแมลงหวี่ได้น้อยในช่วงเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ส่วนใหญ่อยู่ในต้นมันสำปะหลังต้นใหญ่ที่ยังไม่เก็บเกี่ยว และพืชอาศัยข้างแปลง เช่น ต้นฝรั่ง ต้นพริก และวัชพืชเป็นต้น และเริ่มพบกลับมาวางไข่ในแปลงมันสำปะหลัง ในเดือนมิถุนายน (อาจเป็นเพราะมีการชุบท่อนพันธุ์มันสำปะหลังตอนปลูก ทำให้ไม่พบแมลงหวี่ขาวบนต้นมันสำปะหลังในระยะต้นเล็ก) และพบการวางไข่และจำนวนประชากรแมลงหวี่ขาวมากขึ้นในเดือนกรกฎาคมและสิงหาคม ส่วนการทดลองในปี 2557 พบแมลงหวี่ขาวใยเกลียวมีการระบาดในแปลงมันสำปะหลัง ในเดือนตุลาคม และพฤศจิกายน เริ่มลดลงในเดือนธันวาคม ต่อจากนั้นพบแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้น้อยมากไปจนถึงเดือนสิงหาคม โดยพบมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน แตกต่างจากในปี 2556 ที่พบมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม (รจนา และคณะ, 2556) ซึ่งอาจเนื่องมาจากสภาพอากาศที่แห้งแล้งฝนทิ้งช่วง ซึ่งมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงประชากรของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

3.1.4 ทดสอบพืชอาหาร

ในปี 2555 ทดสอบพืชอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนพืชอาหารชนิดต่าง ๆ โดยเก็บตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวใยเกลียวจากแปลงมันสำปะหลัง มาทดสอบพืชอาหารของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวในกรงโดยใช้ต้นมันสำปะหลัง ต้นมะเขือ พริก ฝรั่ง ตำแยแมว และหญ้ายาง พบว่า แมลงหวี่ขาวสามารถวางไข่บนพืชทุกชนิดที่นามาทดสอบ มีแนวโน้มว่าจะชอบฝรั่งมากที่สุด รองลงมา ได้แก่ มันสำปะหลัง หญ้ายาง และตำแยแมว ต่อมาในปี 2556 ทดสอบกับ ฝรั่ง มันสำปะหลัง ถั่วเขียว ถั่วดำ หญ้ายาง ตำแยแมว พริก และคริสมาสต์ เพื่อหาวิธีเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นพืชที่สามารถปลูกได้เป็นปริมาณมากและง่าย พบว่า แมลงหวี่ขาวใยเกลียวชอบวางไข่บน ต้นคริสมาสต์ ฝรั่ง หญ้ายาง และมันสำปะหลัง ส่วนชนิดอื่นก็สามารถวางไข่และเจริญเติบโตได้ แต่จากการวิเคราะห์ความ

เหมาะสมและความเป็นไปได้ที่จะเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียว เพื่อเพาะเลี้ยงและรักษาสายพันธุ์แมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้นาน พืชที่เหมาะสมจะเป็น ต้นฝรั่ง มากกว่า ต้นคริสต์มาส เนื่องจากใบต้นคริสต์มาสจะร่วงเมื่อมีแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเข้าทำลายมาก ๆ ซึ่งใบฝรั่งจะทนกว่า เพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้เกือบตลอดทั้งปี และสามารถขยายพันธุ์ได้โดยการตอน ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายได้

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงแตนเบียนสกุล *Encarsia* ในห้องปฏิบัติการ

ทำการศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของแตนเบียนสกุล *Encarsia*

4.2.1 วงจรชีวิตของแตนเบียน *Encarsia* sp.

จากการศึกษาวงจรชีวิตแตนเบียนสกุล *Encarsia* โดยการนำแตนเบียน *Encarsia* spp. (สีเหลืองและสีดำ) ที่ออกมาจากตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวมาทดสอบ ให้วางไข่บนแมลงหวี่ขาวใยเกลียววัย 2 และ 3 ที่เลี้ยงไว้บนต้นมันสำปะหลัง ตำแยแมว และหญ้ายาง ในห้องปฏิบัติการ พบการเบียนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นตำแยแมว 8 ตัว จากจำนวนทั้งหมด 11 ตัว และพบว่ามีแตนเบียน *Encarsia* sp. (สีดำ) ออกจากแมลงหวี่ขาวภายหลังจากเริ่มทดลองแล้ว 19 วัน ต่อมานำแตนเบียน *Encarsia* sp. ชนิดที่ 1 (สีดำ) ที่ออกมาจากตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว มาทดสอบให้เข้าเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียววัย 2 และ 3 ที่เลี้ยงไว้บนต้นตำแยแมวในห้องปฏิบัติการ พบการเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นตำแยแมว 4 ตัว และพบว่าแตนเบียน *Encarsia* sp. มีวงจรชีวิต 19 วัน สอดคล้องกับที่ได้ทำการศึกษาที่ผ่านมา และทดสอบการเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่เลี้ยงบนใบฝรั่ง พบว่า แตนเบียนชอบเบียนตัวอ่อนวัย 3 มากที่สุด มีวงจรชีวิต 15-30 วัน เฉลี่ย 21.49 วัน

จากการศึกษาอายุขัยของแตนเบียน *Encarsia* พบว่าแตนเบียน (สีดำ) มีอายุขัย 2-11 วัน เมื่อเลี้ยงในถุงพลาสติกใส่ใบฝรั่งที่มีตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว และมีอายุขัย 1-6 วัน เมื่อเลี้ยงในถุงพลาสติกเปล่า

4.2.2 พฤติกรรมของแตนเบียน *Encarsia* sp.

จากการทดสอบการเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่เลี้ยงบนใบฝรั่ง พบว่า แตนเบียนจะเข้าทำลายเบียนตัวอ่อนวัย 3 มากที่สุด แต่อัตราการเบียนยังต่ำอยู่ระหว่าง 0-36.11% โดยแตนเบียนจะวางไข่ในตัวอ่อนวัย 3 วัย 4 prepupa และดักแด้ เมื่อตัวหนอนแตนเบียนฟักออกจากไข่แล้ว จะอาศัยเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้อยู่ภายในตัวแมลงหวี่ขาวใยเกลียว มองเห็นเป็นดักแด้สีดำอยู่ภายในผนังลำตัวของแมลงหวี่ขาว (Figure 6) และเจาะผนังลำตัวแมลงหวี่ขาวออกเป็นแตนเบียนตัวเต็มวัย เมื่อสังเกตที่คราบแมลงหวี่ขาวที่แตนเบียนออกไปแล้วจะเห็นเป็นรูกลม ต่างจากคราบที่ออกเป็นตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวซึ่งจะมีรอยแยกเป็นลักษณะคล้ายตัว “T” (Figure 7) ในสภาพแปลงแตนเบียนสกุล *Encarsia* จะมีพฤติกรรมการเบียนโดยเลือกเข้าทำลายตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวเฉพาะตัวที่เหมาะสมบนใบมันสำปะหลังใบเดียวกัน ไม่ได้ทำลายทั้งหมด (Figure 8 and 9)

Figure 6 *Encarsia* sp. pupa growths in the spiraling whitefly nymph

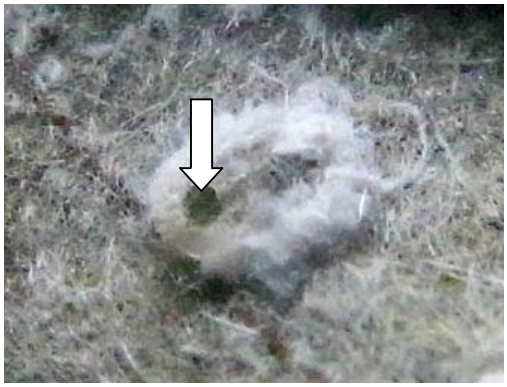


Figure 7 (left) spiraling white fly corpse with an emerged hole of *Encarsia* sp. adult (right) spiraling white fly with a "T" shaped emerged hole of white fly adult

Figure 8 Parasitized spiraling whitefly corpses on cassava leaves after *Encarsia* sp. adults emergence

Figure 9 Not all of spiraling whitefly nymphs were parasitized

4.2.3 การเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Encarsia* sp.

จากการศึกษาเทคนิคเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Encarsia* sp. ชนิดสีดำ ด้วยตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นฝรั่ง โดยปล่อยตัวเต็มวัยแมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่เก็บจากแปลงมันสำปะหลังเข้าไปในกรงเลี้ยงแมลงที่มีต้นฝรั่ง เพื่อให้วางไข่ เพาะเลี้ยงจนได้ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว วัยต่าง ๆ บนใบฝรั่ง จากนั้นใช้ถุงพลาสติกเจาะรูแล้วติดด้วยผ้าตาข่ายไนล่อนชนิดละเอียดหุ้มใบฝรั่งที่มีตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว ปล่อยแตนเบียน *Encarsia* sp. เข้าไปในถุงพลาสติก ให้แตนเบียนเข้าเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ เฝ้าสังเกตจนพบแตนเบียน *Encarsia* sp. ตัวเต็มวัยรุ่นใหม่ออกจากแมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่ใช้เพาะเลี้ยง ซึ่งพบว่าในห้องปฏิบัติการสามารถเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Encarsia* sp. ได้ แต่จากการทดลองพบว่าปริมาณแมลงหวี่ขาวที่เลี้ยงได้ มีการเปลี่ยนแปลงทำนองกับปริมาณแมลงหวี่ขาวที่พบในสภาพแปลงมันสำปะหลัง ทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้มากพอที่จะทดลองการผลิตขยายแตนเบียน *Encarsia* sp.

ปัญหาและอุปสรรค

ระหว่างเดือน มกราคม ถึง สิงหาคม พบแมลงหวี่ขาวในแปลงน้อยมาก และบางช่วงระยะเวลาไม่สามารถเพิ่มประชากรแมลงหวี่ขาวที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้มากพอ ทำให้การทดลองการเพาะเลี้ยงแตนเบียนไม่สามารถดำเนินการได้ตามแผน

Table 1 Parasitism percentage by *Encarsia* spp. on spiraling whitefly nymph collected from cassava fields during October 2012 to September 2014

A. during October 2012 to September 2013

	Parasitism (%)											
	Oct.12	Nov.12	Dec.12	Jan.13	Feb.13	Mar.13	Apr.13	May13	Jun.13	Jul.13	Aug.13	Sep.13
Min.	1.04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Max.	8.91	22.86	3.22	12.0	1.19	15.94	1.90	17.65	23.68	57.14	10.44	22.50

B. during October 2013 to September 2014

	Parasitism (%)											
	Oct.13	Nov.13	Dec.13	Jan.14	Feb.14	Mar.14	Apr.14	May14	Jun.14	Jul.14	Aug.14	Sep.14
Min.	10.00	21.74	4.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0.93
Max.	72.72	77.42	54.35	45.45	7.56	1.31	4.28	3.30	0	2.82	6.47	36.11

Table 2 Species composition of *Encarsia* spp. emerged from spiraling whitefly collected from cassava fields during October 2012 to September 2014

A. during October 2012 to September 2013

	Composition (%)											
	Oct.12	Nov.12	Dec.12	Jan.13	Feb.13	Mar.13	Apr.13	May13	Jun.13	Jul.13	Aug.13	Sep.13
sp.1 (black)	-	-	-	-	-	0	0	0	10.00	5.56	26.09	9.68
sp.2 (yellow)	-	-	-	-	-	100	100	100	90.00	94.44	73.91	90.32

B. during October 2013 to September 2014

	Composition (%)											
	Oct.13	Nov.13	Dec.13	Jan.14	Feb.14	Mar.14	Apr.14	May14	Jun.14	Jul.14	Aug.14	Sep.14
sp.1 (black)	50.00	4.88	0	40.00	0	-	0	0	-	-	0	16.67
sp.2 (yellow)	50.00	95.12	100	60.00	100	-	100	100	-	-	100	83.33

การทดลองที่ 1.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแมลงช้างปีกใสในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของแมลงช้างปีกใสในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ ในปี 2554 ได้ดำเนินการสำรวจ และเก็บรวบรวมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว จำนวน 6 ครั้ง ใน จังหวัดชลบุรี ระยอง สุพรรณบุรี ชัยนาท และ จังหวัดนครราชสีมา พบการระบาดของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวใน มันสำปะหลัง มะละกอ พริก ถั่ว และพวกวัชพืชต่างๆ และจากการสำรวจ พบแมลงศัตรูธรรมชาติ คือ แตนเบียน ด้วงเต่า และแมลงช้างปีกใส นำแมลงช้างปีกใสมาเลี้ยงเพื่อตรวจดูชนิดพบว่าเป็นชนิด *Plesiochrysa ramburi* และ*Malada basalis* ต่อจากนั้นนำแมลงหวี่ขาวใยเกลียวมาเพาะเลี้ยงบนต้นมันสำปะหลัง และต้นชบา เพื่อใช้ ไข่ และตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว มาเป็นเหยื่ออาหารของแมลงช้างปีกใส โดยใช้ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *M. basalis* *P. ramburi* และ *C. carner* วัย 1 ชนิดละ 100 ตัว ให้แมลงหวี่ขาวใยเกลียวในระยะไข่ และระยะตัวอ่อนเป็นอาหาร บันทึกข้อมูลประสิทธิภาพการกินตลอดช่วงเวลาที่เป็นระยะตัวอ่อนวัย 1 วัย 2 และวัย 3 พบว่า *M. basalis* *P. ramburi* และ *C. carner* สามารถกินไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ 86.15 ± 16.64, 175.70 ± 28.57, 254.85 ± 36.87 และ 71.60 ± 12.72, 144.45 ± 23.59, 302.10 ± 51.94 และ 48.00±13.23 84.05 ±12.67 152.80 ± 39.3 ฟองตามลำดับ (ตารางที่ 1) รวมตลอดระยะตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใส *M. basalis* *P. ramburi* และ *C. carner* สามารถทำลายไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้เฉลี่ย 526.2 ± 518.15±6.06 และ 282.90± 48.06 ฟองตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากผลการทดลอง *M. basalis* **และ** *P. ramburi* มีประสิทธิภาพในการกินไข่ของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ดีกว่า *C. carner* และพบว่า *M. basalis* *P. ramburi* และ *C. carner* สามารถกินตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ 25.75 ± 7.81 66.75 ± 14.97 84.70 ± 54 .44 ,37.30 ± 8.24 89.75 ± 36.75 205.20 ± 50.99 และ 22.4 ± 9.86 36.8 ±7.53 96.8±12.061ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ตลอดระยะตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใส *M. basalis* *P.ramburi* และ *C. carner* สามารถทำลายตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้เฉลี่ย 277.2 ± 59.46 332.25 ± 81.43 และ 96.8 ± 12.061 ตัวตามลำดับ (ตารางที่ 2) ในการทำลายตัวอ่อน *P. ramburi* มีประสิทธิภาพดีที่สุด ส่วน *M. basalis* มีประสิทธิภาพรองลงมา ซึ่งประสิทธิภาพการกินตัวอ่อนของ *M. basalis* สอดคล้องกับการรายงานของ Mani and Krishnamoorhy**.** 1999 ที่ได้ทดลองประสิทธิภาพการกินของแมลงช้างปีกใส *Malada astus* ซึ่งเป็นแมลงช้างปีกใสที่พบในแหล่งที่มีการระบาดของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวแถบทางตอนใต้ของอินเดีย พบว่าทั้งระยะที่ 1 2และ3 ของตัวอ่อนแมลงช้างปีกใสชนิดนี้สามารถกิน ระยะตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ 36.4 60.2 และ138.3 ตามลำดับ โดยเฉลี่ยสามารถกินตัวอ่อนของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ ประมาณ 200 ตัว นอกจากนั้นมีรายงานว่า M. *astus* เป็นตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายระยะไข่ และในระยะตัวอ่อนวัยที่1ของแมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่เพิ่งฟักจากไข่ มากกว่าที่จะเข้าทำลายระยะตัวอ่อนวัย2-3 ของแมลงหวี่ขาวใยเกลียว (Geetha. 2000) จากการทดสอบประสิทธิภาพของแมลงช้างปีกใสทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวปัจจัยทางด้านชีววิทยา รูปร่างลักษณะก็มีความแตกต่างกัน และแมลงช้างปีกใสทั้ง 3 ชนิดก็อยู่ใน 3 สกุล คือ สกุล Mallada สกุล Plesiochrysa และ สกุล Chrysoperla (ประภัสสร 2551) ดังนั้นอัตราการกินก็จะแตกต่างกันไป

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการกินไข่ และตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว ของแมลงช้างปีกใส 3 ชนิด *Malada basalis* *Plesiochysa ramburi* และ *Chysopa carner*

แมลงช้างปีกใส	อัตราการกิน ไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียว(ฟอง) Mean ± SD	ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว(ตัว) Mean ± SD
Malada basalis		
ตัวอ่อนวัยที่ 1	86.15 ± 16.64	25.75 ± 7.81
ตัวอ่อนวัยที่ 2	175.70 ± 28.57	66.75 ± 14.97
ตัวอ่อนวัยที่ 3	254.85 ± 36.87	84.70 ± 54.44
Plesiochysa ramburi		
ตัวอ่อนวัยที่ 1	71.60 ± 12.72	37.30 ± 8.24
ตัวอ่อนวัยที่ 2	144.45 ± 23.59	89.75 ± 36.75
ตัวอ่อนวัยที่ 3	302.10 ± 51.94	205.20 ± 50.99
Chysopa carner		
ตัวอ่อนวัยที่ 1	48.00 ± 13.23	22.4 ± 9.86
ตัวอ่อนวัยที่ 2	84.05 ± 12.67	36.8 ± 7.53
ตัวอ่อนวัยที่ 3	152.80 ± 39.35	96.8 ± 12.061

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยประสิทธิภาพการกินไข่ และตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว ของระยะตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส 3 ชนิด *Malada basalis* *Plesiochysa ramburi* และ *Chysopa carner*

แมลงช้างปีกใส	ค่าเฉลี่ยการกินตลอดระยะที่เป็นตัวอ่อน ไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียว(ฟอง) Mean ± SD	ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว(ตัว) Mean ± SD
Malada basalis	526.2 ± 47.35	277.2 ± 59.46
Plesiochysa ramburi	518.15± 66.06	332.25 ± 81.43
Chysopa carner	282.90±48.06	158.9 ± 31.17

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช

การทดลองที่ 1.2.1 พัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาต *Sycanus versicolor* Dohrn

ผลการทดลอง

ดำเนินการศึกษาพัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาตประกอบด้วย 4 การทดลองย่อย คือ

1. ผลของอาหารต่อการเจริญเติบโตของมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* เพื่อหาชนิดของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตขยายมวนเพชฌฆาต พบว่าเมื่อใช้ดักแด้หนอนนกเลี้ยงมวนเพชฌฆาตจะทำให้มวนเพชฌฆาตตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้สูงสุดเฉลี่ย 534.6 $\pm$ 67.6 ฟอง โดยจำนวนไข่มีช่วงกว้าง 454 - 630 ฟอง จำนวนกลุ่มไข่เฉลี่ย 5.0 กลุ่ม และ ไข่มีความสามารถในการฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้เฉลี่ย 85.8 $\pm$ 6.1% รองลงมาคือหนอนกระทู้ผักจะทำให้มวนเพชฌฆาตตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้เฉลี่ย 431.6 $\pm$

75.1 ฟอง โดยจำนวนไข่มีช่วงกว้าง 367 - 540 ฟอง จำนวนกลุ่มไข่เฉลี่ย 4.3 กลุ่ม และ ไข่มีความสามารถในการฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้เฉลี่ย 84.2 $\pm$ 4.8 % รองลงมาอีกคือหนอนนกรวมกับดักแด้หนอนนกจะทำให้มวนเพชฌฆาตตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้เฉลี่ย 399.2 $\pm$ 64.5 ฟอง โดยจำนวนไข่มีช่วงกว้าง 329 - 460 ฟอง จำนวนกลุ่มไข่เฉลี่ย 3.8 กลุ่ม และ ไข่มีความสามารถในการฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้เฉลี่ย 80.9 $\pm$ 8.1% สำหรับหนอนนกเมื่อนำมาใช้เลี้ยงมวนเพชฌฆาตจะทำให้มวนเพชฌฆาตตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้น้อยที่สุดเฉลี่ย 280.6 $\pm$ 38.4 ฟอง โดยจำนวนไข่มีช่วงกว้าง 266 - 324 ฟอง จำนวนกลุ่มไข่เฉลี่ย 2.9 กลุ่ม แต่ ไข่มีความสามารถในการฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้ไม่ต่างกับมวนที่เลี้ยงด้วยหนอนนกรวมกับดักแด้หนอนนกเฉลี่ย 79.7 $\pm$ 12.8 % (ตารางที่ 1)

ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจาก ทัศนีย์, นุชรีย์ และ สุนิสา (2557) ที่รายงานว่า S. collaris ที่เลี้ยงด้วยหนอนไหมสามารถวางไข่ได้ 177.78 ± 17.10 ฟอง ไข่มีความสามารถในการฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้เฉลี่ย 86.35% ที่อุณหภูมิห้อง 28.08 ± 1.30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 74.29 ± 4.24 % Das and Mukhopadhyay (2008) ที่รายงานว่าเมื่อเลี้ยงมวนเพชฌฆาต *S. croceovittatus* ด้วยปลวก (*Coptotermes* sp.) สามารถวางไข่ได้ 134.37 ฟอง Sahayaraj and Paulraj (2001) ที่รายงานว่าเมื่อเลี้ยงมวนเพชฌฆาต *Rhynocoris marginatus(* F.) ด้วยหนอนกระทู้ผักสามารถวางไข่ได้ 405.28 $\pm$ 22.15 ฟอง Sahayaraj and Sathiamoorthi (2002) ที่รายงานว่า มวนเพชฌฆาต *Rhynocoris marginatus* (F.) เมื่อเลี้ยงด้วยหนอนผีเสื้อข้าวสาร *Corcyra cephalonica* วางไข่ได้ 100.97 ฟอง แต่ถ้าเลี้ยงด้วยหนอนกระทู้ผักสามารถวางไข่ได้ 148.74 ฟอง

2. จำนวนที่เหมาะสมของมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* Dohrn ที่ผลิตขยายต่อภาชนะ

2.1 จำนวนที่เหมาะสมของมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนที่ผลิตขยายต่อภาชนะ พบว่า การเลี้ยงมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนจำนวน 100 และ 150 ตัว/กล่อง เหมาะสมที่สุดเพราะทำให้มวนสามารถเป็นตัวเต็มวัยมากที่สุด 73.5 และ 78.3 % ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างทางสถิติกับการเลี้ยงมวนระยะตัวอ่อนจำนวน 200 และ 250 ตัว/กล่อง ซึ่งทำให้มวนสามารถเป็นตัวเต็มวัยได้เพียง 57.5 และ 53.0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

2.2 จำนวนที่เหมาะสมของมวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยที่ผลิตขยายต่อภาชนะ พบว่าการเลี้ยงมวนระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ต่อเพศเมียจำนวน 40 : 40 คู่ต่อกล่อง เหมาะสมที่สุดเพราะทำให้มวนตัวเต็มวัยสามารถวางไข่ได้มากที่สุด 5.17 กลุ่มต่อตัว หรือ 428.97 ฟอง/ตัว รองลงมาคือที่ 30 : 30 และ 25 : 25 คู่ต่อกล่อง เพราะทำให้มวนตัวเต็มวัยสามารถวางไข่ได้ 4.63 และ 4.55 กลุ่ม/ตัว ตามลำดับ หรือ 370.87 และ 340.07 ฟอง/ตัว ตามลำดับ ซึ่งการเลี้ยงที่จำนวน 25 : 25 ถึง 40 : 40 คู่ต่อกล่อง ทำให้มวนตัวเต็มวัยสามารถวางไข่ได้จำนวนกลุ่มไข่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างทางสถิติกับการเลี้ยงมวนระยะตัวเต็มวัยจำนวน 20 : 20, 50 : 50 และ 60 : 60 คู่ต่อกล่อง ซึ่งทำให้มวนตัวเต็มวัยสามารถวางไข่ได้ 3.65, 3.94 และ 3.77 กลุ่ม/ตัว ตามลำดับ หรือ 354.5, 327.40 และ 312.58 ฟอง/ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

3. การเก็บรักษามวนเพชฌฆาต *S. versicolor* และเหยื่ออาหาร (ดักแด้หนอนนก) ของมวนเพชฌฆาต (ปี 2556) มี 2 หัวข้อ คือ

3.1 การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.1 การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส นาน 0 และ 1 สัปดาห์ เหมาะสมที่สุด เพราะทำให้ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 มีชีวิตรอดมากที่สุดคือ 100 และ 86.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเก็บตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตที่ระยะเวลานาน 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยการเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 2 สัปดาห์ ทำให้ตัวอ่อนมวน

เพชฌฆาตมีชีวิตรอด 44.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 3 และ 4 สัปดาห์ ทำให้ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตมีชีวิตรอดน้อยที่สุดคือ 14.00 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

3.1..2 การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13.73 $\pm$ 0.29 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13.73 $\pm$ 0.29 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 สัปดาห์เหมาะสมที่สุด เพราะทำให้ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 มีชีวิตรอดมากที่สุดคือ 100, 86.00 และ 80.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 5) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเก็บตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ที่ระยะเวลานาน 3 และ 4 สัปดาห์ โดยการเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 3 สัปดาห์ ทำให้ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตมีชีวิตรอด 60.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมินาน 4 สัปดาห์ ทำให้ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตมีชีวิตรอดน้อยที่สุดคือ 14.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

3.2 การเก็บรักษาเหยื่ออาหาร (ดักแด้หนอนนก) ของมวนเพชฌฆาต ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ พบว่าการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 2 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส นาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ ทำให้ดักแด้หนอนนกรอดชีวิต 100, 100, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) และการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 3 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส นาน 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ จะทำให้ดักแด้หนอนนกรอดชีวิต 100, 99.50, 97.00, 95.50 และ 95.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6) สำหรับการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 4 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส นาน 0, 1 และ 2 สัปดาห์ จะทำให้ดักแด้หนอนนกรอดชีวิตมากที่สุดคือ 94.50, 98.00 และ 84.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 4 วัน นาน 3 และ 4 สัปดาห์ เพราะทำให้ดักแด้หนอนนกรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 83.00 และ 80.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ(ตารางที่ 6) สำหรับการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 5 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส นาน 0 และ 1 สัปดาห์ จะทำให้ดักแด้หนอนนกมีรอดชีวิตมากที่สุดคือ 93.50 และ 95.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเก็บดักแด้หนอนนกนาน 2, 3 และ 4 สัปดาห์ เพราะทำให้ดักแด้หนอนนกรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 79.50, 75.00 และ 26.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 6 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส จะให้ผลเช่นเดียวกันคือการเก็บดักแด้หนอนนกนาน 0 และ 1 สัปดาห์ จะทำให้ดักแด้หนอนนกมีรอดชีวิตมากที่สุดคือ 93.50 และ 91.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับโดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเก็บดักแด้หนอนนกนาน 2, 3 และ 4 สัปดาห์ เพราะทำให้ดักแด้หนอนนกรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ 72.00, 66.00 และ 7.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

4. ต้นทุนการผลิตมวนเพชฌฆาต *S. versicolor* Dohrn (ปี 2557)

การศึกษาต้นทุนการผลิตมวนเพชฌฆาต ศึกษากับมวน 3 ระยะคือ

4.1. ระยะตัวอ่อน พบว่าการผลิตมวนระยะตัวอ่อนจำนวน 150 ตัวต่อกล่อง ใช้ดักแด้และหนอนนกจำนวน 1,114.10 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 7.13 บาท (ตารางที่ 7)

4.2 ระยะตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยตาย พบว่าการผลิตมวนตลอดชีวิต โดยเริ่มจากการเลี้ยงมวนระยะตัวอ่อนจำนวน 150 ตัวต่อกล่อง จนตัวเต็มวัยตาย ใช้ดักแด้และหนอนนกจำนวน 1,886.10 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 12.01 บาท (ตารางที่ 8)

4.3. ระยะตัวเต็มวัย พบว่าการผลิตมวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ต่อเพศเมีย จำนวน 40 ต่อ 40 ตัวต่อกล่อง ใช้หนอนนกจำนวน 908.80 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 5.82 บาท (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 1. จำนวนเฉลี่ยของกลุ่มไข่, ไข่ทั้งหมด, ช่วงกว้างของจำนวนไข่ต่อตัวเมีย 1 ตัว และเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของ *Sycanus versicolor* Dohrn. ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่างๆ ในห้องปฏิบัติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2554.

ชนิดของอาหาร	กลุ่มไข่เฉลี่ยต่อตัวเมีย 1 ตัว	จำนวนไข่เฉลี่ย (ฟอง)ต่อตัวเมีย 1 ตัว (Mean+SD.)	ช่วงกว้างของจำนวนไข่ต่อตัวเมีย 1ตัว (Range)	ไข่ฟัก (%) (Mean+SD.)
หนอนนก	2.9	280.6 ± 38.4	266 - 324	79.7 ± 12.8
ดักแด้หนอนนก	5.0	534.6 ± 67.6	454 - 630	85.8 ± 6.1
หนอนนกและดักแด้หนอนนก	3.8	399.2 ± 64.5	329 - 460	80.9 ± 8.1
หนอนกระทู้ผัก	4.3	431.6 ± 75.1	367 - 540	84.2 ± 4.8

ตารางที่ 2. จำนวนมวนเพชฌฆาต, *Sycanus versicolor* Dohrn. ระยะตัวเต็มวัยที่ได้จากการเลี้ยงมวนระยะตัวอ่อนที่จำนวนต่างๆต่อกล่อง ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2555

จำนวนมวนตัวอ่อน(ตัว)/กล่อง	จำนวนมวนที่เป็นตัวเต็มวัย (%)
100	73.5a [1/]
150	78.3a
200	57.5b
250	53.0b

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5% โดย DMRT.

ตารางที่ 3. จำนวนกลุ่มไข่มวนเพชฌฆาต, *Sycanus versicolor* Dohrn. ที่ได้จากการเลี้ยงมวนตัวเต็มวัยเพศผู้ : เพศเมียที่จำนวนต่างๆต่อในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2555

จำนวนมวนตัวเต็มวัย ตัวผู้ต่อตัวเมีย(ตัว)/กล่อง	กลุ่มไข่เฉลี่ย(กลุ่ม) ต่อตัวเมีย 1 ตัว	จำนวนไข่เฉลี่ย(ฟอง) ต่อตัวเมีย 1 ตัว
20:20	3.65b [1/]	354.52
25:25	4.55ab	340.07
30:30	4.63ab	370.87
40:40	5.17a	428.97
50:50	3.94b	327.40
60:60	3.77b	312.58

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5% โดย DMRT.

ตารางที่ 4. เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของตัวอ่อนวัย 4 ของมวนเพชฌฆาต, *Sycanus versicolor* Dohrn. ต่อกล่อง หลังจากเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2556

ระยะเวลาในการเก็บ (สัปดาห์)	**% การรอดชีวิตเฉลี่ยของมวนตัวอ่อน/กล่อง**
0	100.00a [1/]
1	86.00a
2	44.00b
3	14.00c
4	10.00c

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5% โดย DMRT.

ตารางที่ 5. เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของตัวอ่อนวัย 4 ของมวนเพชฌฆาต, *Sycanus versicolor* Dohrn. ต่อกล่อง หลังจากเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 13.73 ± 0.29 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2556

ระยะเวลาในการเก็บ (สัปดาห์)	% การรอดชีวิตเฉลี่ยของมวนตัวอ่อน/กล่อง
0	100.00a [1/]
1	86.00a
2	80.00ab
3	60.00b
4	14.00c

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5% โดย DMRT

ตารางที่ 6. เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของดักแด้หนอนนกที่อายุต่างๆต่อกล่อง หลังจากเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 ± 0.34 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาต่างๆ ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2556

ระยะเวลาในการเก็บ	% การรอดชีวิตเฉลี่ยของดักแด้หนอนนกที่อายุต่างๆ(วัน)/กล่อง				
(สัปดาห์)	2	3	4	5	6
0	100.00a [1/]	100.00a	94.50ab	93.50a	93.50a
1	100.00a	99.50a	98.00a	95.50a	91.50a
2	100.00a	95.50a	84.50ab	79.50b	72.00b
3	100.00a	95.50a	83.00b	75.00b	66.00b
4	100.00a	97.00a	80.50b	26.50c	7.00c

[1/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 5% โดย DMRT.

ตารางที่ 7. จำนวนหนอนนกและดักแด้ที่ถูกกินโดยมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อน จำนวน 150 ตัวต่อกล่อง และราคาอาหารไก่ที่ใช้เลี้ยงหนอนนก ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2557

ซ้ำที่	จำนวนดักแด้และหนอนนก (ตัว) ที่ถูกมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนกิน	ราคาอาหารไก่ที่ใช้เลี้ยงหนอนนก (บาท)
1	1,117	7.15
2	1,113	7.12
3	1,112	7.12
4	1,129	7.23
5	1,091	6.98
6	1,130	7.23
7	1,098	7.03
8	1,109	7.10
9	1,123	7.19
10	1,119	7.16
รวม	1114.10	7.13

ราคาอาหารไก่กระสอบละ (30 กิโลกรัม) = 480 บาท

ตารางที่ 8. จำนวนหนอนนกและดักแด้ที่ถูกกินโดยมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนและตัวต็มวัย จำนวน 150 ตัวต่อกล่อง และราคาอาหารไก่ที่ใช้เลี้ยงหนอนนก ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2557

ซ้ำที่	จำนวนดักแด้และหนอนนก (ตัว) ที่ถูกมวนเพชฌฆาตระยะตัวอ่อนและตัวต็มวัยกิน	ราคาอาหารไก่ที่ใช้เลี้ยงหนอนนก (บาท)
1	1897	12.14
2	2006	12.84
3	1919	12.28
4	1720	11.01
5	1737	11.12
6	1934	12.38
7	1870	11.97
8	1947	12.46
9	1923	12.31
10	1908	12.21
รวม	1886.10	12.01

ราคาอาหารไก่กระสอบละ (30 กิโลกรัม) = 480 บาท

ตารางที่ 9. จำนวนหนอนนกที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงมวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ : เพศเมีย จำนวน 40 : 40 ตัวต่อกล่อง และราคาอาหารไก่ที่ใช้เลี้ยงหนอนนก ในห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2557

ซ้ำที่	จำนวนหนอนนก (ตัว) ที่ถูกมวนเพชฌฆาตระยะตัวต็มวัยกิน	ราคาอาหารไก่ที่ใช้เลี้ยงหนอนนก (บาท)
1	907	5.80
2	874	5.63
3	946	6.05
4	935	5.98
5	896	5.73
6	913	5.84
7	881	5.64
8	928	5.94
9	887	5.68
10	921	5.89
รวม	908.80	5.82

ราคาอาหารไก่กระสอบละ (30 กิโลกรัม) = 480 บาท

การทดลองที่ 1.2.2 พัฒนาการเพาะเลี้ยงและศักยภาพการเป็นตัวห้ำของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis epius* (Lepidoptera:Lycaenidae)

ผลการทดลอง

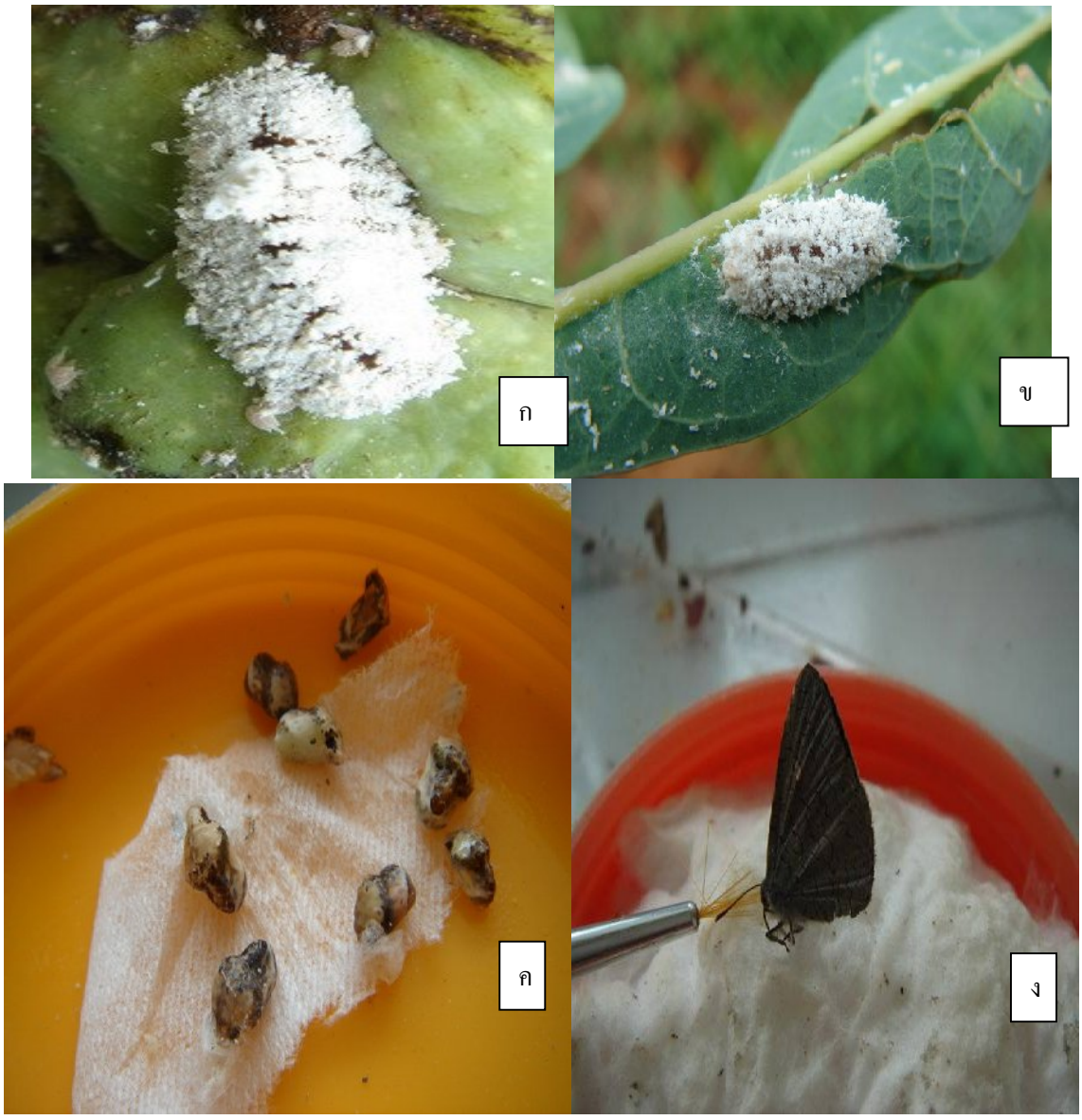
การพัฒนาการเพาะเลี้ยง และศักยภาพการเป็นตัวห้ำของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis* epius ได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมผีเสื้อตัวห้ำจากแหล่งที่มีการระบาดของเพลี้ยแป้ง ระหว่าง เดือนธันวาคม 2554 ถึง กันยายน 2555 พบผีเสื้อตัวห้ำ *S.* epius ในระยะตัวเต็มวัย 5 ตัว ระยะตัวหนอน 172 ตัว และระยะดักแด้ 37 ดักแด้ ในพืช 6 ชนิด คือ มันสำปะหลัง น้อยหน่า ชบา มะเขือยาว มะม่วง และวัชพืช สำรวจใน 2 จังหวัด คือ นครราชสีมา และนครปฐม (ตารางที่ 2) ระยะตัวเต็มวัยแยกเพศได้เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 4 ตัว ในระยะตัวหนอนในแหล่งที่พบน่าจะมีปริมาณมากกว่าที่รายงานแต่เนื่องจากในระยะวัยที่ 1 และ2 ผู้ทำการทดลองจะไม่ได้สังเกต ส่วนมากที่เก็บมาจะเป็นระยะที่ 3 และ 4 การศึกษาชีววิทยาของ ผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* เบื้องต้นได้ผลดังนี้ (ตารางที่ 1) ระยะไข่ มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน ใกล้ฟักจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ไข่มีอายุ 3-5 วัน ระยะตัวอ่อน มี 4 ระยะ ตัวอ่อนมีอายุ เฉลี่ย 11.45 ± 1.32 วัน ประมาณ 10 - 13 วัน ตัวอ่อนระยะที่ 4 (ภาพ 1 ก) ระยะก่อนเข้าดักแด้ จะมีลักษณะเหมือนตัวอ่อนระยะที่ 4 แต่ไม่เคลื่อนไหว มีอายุเฉลี่ย 1 ± 0.18 หรือระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน (ภาพ 1ข) ระยะดักแด้ มีอายุเฉลี่ย 8 ± 0.79 ประมาณ 7-9 วัน (ภาพ 1ค) ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางวันขนาดเล็ก (ภาพ 1ง) รวมระยะไข่ถึงระยะดักแด้ เฉลี่ย 24.72 ± 2.04 ประมาณ 22-29.5 วัน

ตารางที่ 1 แสดงระยะการเจริญเติบโตของระยะไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis epius* ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส

ระยะการเจริญเติบโต	Mean ± S.D. (วัน)	Range (วัน)
ระยะไข่	4.2 ± 0.77	3-5
ระยะตัวอ่อน	11.45 ± 1.32	10-13
ระยะก่อนเข้าดักแด้	1 ± 0.18	1-2
ระยะดักแด้	8 ± 0.79	7-9
รวมระยะไข่ถึงระยะดักแด้	24.72 ± 2.04	22-29.5

ตารางที่ 2. แสดงชนิดพืช ศัตรูพืชสถานที่ และระยะที่พบ ผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis* epius ระหว่างเดือน ธันวาคม 2554 ถึง กันยายน 2555

เดือน/ปี	พืช/ศัตรูพืช	ระยะS.*epius* /จำนวน	สถานที่
ธันวาคม 2554	มันสำปะหลัง/เพลี้ยแป้ง	ตัวหนอน/20ตัว	นครราชสีมา
มกราคม 2555	มันสำปะหลัง น้อยหน่า/เพลี้ยแป้ง	ตัวหนอน/42ตัว	นครราชสีมา
กุมภาพันธ์ 2555	มันสำปะหลัง วัชพืช/เพลี้ยแป้ง	ตัวหนอน/15ตัว ดักแด้/9ดักแด้	นครราชสีมา
มีนาคม 2555	ชบา ผลมะม่วง มะเขือยาว/เพลี้ยแป้ง	ตัวเต็มวัย 3 ตัว ตัวหนอน/10ตัว	นครราชสีมา นครปฐม
เมษายน 2555	น้อยหน่า ชบา/เพลี้ยแป้ง	ตัวหนอน/12 ตัว	นครราชสีมา
พฤษภาคม 2555	น้อยหน่า มะละกอ/เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย	ตัวเต็มวัย 2 ตัว ตัวหนอน/32ตัว ดักแด้/6ดักแด้	นครราชสีมา
มิถุนายน 2555	มันสำปะหลัง วัชพืช/เพลี้ยแป้ง	ตัวหนอน/11 ตัว ดักแด้/8 ดักแด้	นครราชสีมา
กรกฎาคม 2555	ชบา มะเขือยาว/เพลี้ยแป้ง	ตัวหนอน/10ตัว	นครปฐม
สิงหาคม 2555	น้อยหน่า มะละกอ/เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย	ตัวหนอน/8ตัว ดักแด้ / 12 ตัว	นครราชสีมา
กันยายน 2555	น้อยหน่า มะละกอ/เพลี้ยแป้ง เพลี้ยหอย	ตัวหนอน/12 ตัว ดักแด้ / 2 ตัว	นครราชสีมา



รูปภาพ 1. *Spalgis* epius ก) ตัวหนอนวัยที่ 3 ข) ตัวหนอนวัยที่ 4 ค) ระยะดักแด้ ง) ตัวเต็มวัย

การทดลองที่ 1.2.3 ชนิดและศักยภาพการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ*Stethorus* spp.ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชบนมันสำปะหลัง

ผลการทดลอง

ชนิดและศักยภาพการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp. ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชบนมันสำปะหลังโดยทำการสำรวจรวบรวมตัวอย่างด้วงเต่าตัวห้ำจากแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย ระหว่างเดือนตุลาคม2557 ถึงกันยายน2558 โดยสำรวจเก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงเต่าตัวห้ำจำนวน 30 แปลง จากแหล่งปลูกในจังหวัดกำแพงเพชรพิจิตร ตาก กรุงเทพ กาญจนบุรี ระยอง สุพรรณบุรีอ่างทอง ชัยนาท ลพบุรี สระบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว นครราชสีมา ขอนแก่น อุดรธานี และบุรีรัมย์(Table 1) พบเป็นด้วงเต่าตัวห้ำในสกุล *Stethorus* 3 ชนิด คือ*Stethorus pauperculus* (Weise), *Stethorusindira* Kapur และ *Stethorus siphonulus* Kapur

การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินระยะไข่ของไรศัตรูพืชชนิดต่างๆพบว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus*(Figure 4) สามารถกินระยะไข่ของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*ได้เฉลี่ย 168.50 ฟองต่อวัน มากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับไรแดงหม่อน *T. truncatus*, ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* และไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ที่สามารถกินได้เฉลี่ย115.65,104.50และ 127.45ฟองต่อวัน ตามลำดับ(Table 2)ซึ่งจากการทดลองนี้ พบว่า ตัวเต็มวัยของด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus* สามารถกินระยะไข่ของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus* ได้ใกล้เคียงกับรายงานของ จุรีรัตน์ และคณะ (2551) ที่พบว่า *S. pauperculus* สามารถกินระยะไข่ของไรสองจุด *T. urticae*ได้เฉลี่ย144 ฟองต่อวัน และ ศิริลักษณ์ และนุชรีย์ (2556) รายงานว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. indira* สามารถกินระยะไข่ของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*ได้146.85 ฟองต่อวัน แต่วัฒนา และคณะ(2544) รายงานว่า ไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*, ไรแดงหม่อน *T. truncatus* และไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*สามารถวางไข่ได้เพียง3.38, 5.28 และ 5.71ฟองต่อวัน และวางไข่ตลอดอายุขัยได้ 14.10, 64.00 และ 62.25 ฟองตามลำดับจะเห็นได้ว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus*มีศักยภาพในการกินไข่ไรแดงแอฟริกัน *E. africanus,*ไรแดงหม่อน *T. truncatus* และไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*ได้49.85, 21.90 และ 18.30 เท่าของความสามารถในการวางไข่ต่อวันและ 11.95, 1.80 และ 1.67เท่าของจำนวนไข่ตลอดอายุขัยของไรตามลำดับนอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะไข่ของไรแต่ละชนิด พบว่า ไข่ของไรแดงหม่อน *T. truncatus* และ ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*มีลักษณะกลม ไข่ของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus* มีลักษณะกลมแบนคล้ายกระดุม ส่วนไข่ของไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* มีลักษณะกลมด้านบนค่อนข้างแบน ซึ่งลักษณะของไข่อาจมีผลต่อการกินของด้วงเต่าตัวห้ำและเมื่อเปรียบเทียบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำกับตัวห้ำของไรศัตรูพืชชนิดอื่น Naher*et al*. (2005) และ Gotoh, *et al*. (2004) พบว่า ตัวเต็มวัยของไรตัวห้ำ *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, *Amblyseius californicus*, ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟตัวห้ำ *Scolothrips sexmaculatus* Pergande, *S. takahashii,*ตัวเต็มวัยของด้วงเต่าตัวห้ำ *S. puntillum* Weise และ *S. japonicas*สามารถกินระยะไข่ของไรสองจุด *T. urticae*ได้ 27.54,13.40,58.80, 23.00,119.67และ 294.40 ฟองต่อวัน ตามลำดับ(Table 3)

การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินระยะตัวอ่อนของไรศัตรูพืชชนิดต่างๆพบว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus* (Figure 4) สามารถกินระยะตัวอ่อนของไรแดงหม่อน *T. truncatus*, ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai*, ไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis*และไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*ได้ 47.10, 52.90, 55.35 และ 55.90 ตัวต่อวัน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ(Table 2)และใกล้เคียงกับรายงานของ ศิริลักษณ์ และนุชรีย์ (2556) ที่พบว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. indira* สามารถกินระยะตัวอ่อนของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus* ได้49.35 ตัวต่อวันและเมื่อเปรียบเทียบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำกับตัวห้ำของไรศัตรูพืชชนิดอื่น Naher*et al*. (2005) พบว่า ตัวเต็มวัยของไรตัวห้ำ *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟตัวห้ำ *Scolothrips sexmaculatus* Pergande และตัวเต็มวัยของด้วงเต่าตัวห้ำ *S. puntillum* Weise สามารถกินระยะตัวอ่อนของไรสองจุด *T. urticae*ได้ 18.12, 38.47 และ 73.67ตัวต่อวัน ตามลำดับ

การทดสอบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำในการกินระยะตัวเต็มวัยของไรศัตรูพืชชนิดต่างๆพบว่า ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus* (Figure 4) สามารถกินระยะตัวเต็มวัยของไรแดงแอฟริกัน *E. africanus* ได้เฉลี่ย 18.85 ตัวต่อวัน มากที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับไรแดงหม่อน *T. truncatus*, ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* และไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* ที่สามารถกินได้เฉลี่ย10.50,11.90และ 13.00ตัวต่อวัน ตามลำดับ(Table 2)เมื่อเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะของไรแต่ละชนิด จากรายงานของ วัฒนา และคณะ(2544) พบว่า ไรแดงหม่อน *T. truncatus*, ไรแมงมุมคันซาวา *T. kanzawai* และไรแดงมันสำปะหลัง *O. biharensis* มีลำตัวลักษณะกลมเป็นรูปไข่ มีความยาวของลำตัว

เฉลี่ย 503.66, 355.93 และ 514.07 ไมครอน และมีความกว้างของลำตัวเฉลี่ย 377.33, 279.69 และ 400.00 ไมครอน ตามลำดับ ส่วนไรแดงแอฟริกัน *E. africanus*มีลำตัวลักษณะกลมแบน มีความยาวและความกว้างของลำตัวเฉลี่ย 417.67 และ 350.33 ไมครอน ซึ่งลักษณะของลำตัวอาจมีผลต่อการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ และเมื่อเปรียบเทียบศักยภาพของด้วงเต่าตัวห้ำกับตัวห้ำของไรศัตรูพืชชนิดอื่น Naher*et al*. (2005) พบว่า ตัวเต็มวัยของไรตัวห้ำ *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot, ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟตัวห้ำ *Scolothrips sexmaculatus* Pergande และ ตัวเต็มวัยของด้วงเต่าตัวห้ำ *S. puntillum* Weise สามารถกินระยะตัวเต็มวัยของไรสองจุด *T. urticae*ได้ 11.32, 15.60 และ 54.33ตัวต่อวัน ตามลำดับ

จากการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า ตัวเต็มวัยของด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus*มีศักยภาพในการกินไข่ของไรศัตรูพืชได้สูงกว่าตัวห้ำชนิดอื่น ยกเว้น ด้วงเต่าตัวห้ำ *S. japonicus*(Table 3) แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการเพาะเลี้ยงขยายด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus*ให้ได้ปริมาณมากในประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาในโอกาสต่อไป ในเบื้องต้นนี้ควรมีการอนุรักษ์ด้วงเต่าชนิดนี้ไว้ในแปลงปลูกพืช และควรมีการศึกษาชนิดของสารเคมีที่มีความปลอดภัยต่อด้วงเต่าตัวห้ำ เพื่อให้เกิดความสมดุล และเปิดโอกาสให้ด้วงเต่าตัวห้ำควบคุมไรศัตรูพืช ซึ่งจะส่งผลให้ลดการใช้สารเคมีได้ในอนาคต

Table1 Geographic coordinates*Stethorus* sp.survey on cassava

Locations						
Num.	Sub-district	District	Province	*Stethorus* sp.	Lat. (N)	Long. (E)
1	Sa Kaeo	Mueang	Kamphaeng Phet	*S. pauperculus*	16°28'45.26"	99°35'37.56"
2	Thung Pho Thale	Mueang	Kamphaeng Phet	*S. pauperculus*	16°29'12.79"	99°43'15.28"
3	Pho Sai Ngam	Bueng Na Rang	Phichit	*S. pauperculus*	16°7'25.58"	99°7'55.41"
4	Wang Cho	Mueang	Tak	*S. pauperculus*	16°54'57.38"	99°20'22.97"
5	Chatuchak	Bang Khen	Bangkok	*S. pauperculus*	13°51'21.00"	100°34'23.00"
6	Nong Ya	Mueang	Kanchanaburi	*S. pauperculus*	13°58'55.32"	99°27'32.65"
7	Kaeng Sian	Mueang	Kanchanaburi	*S. pauperculus*	14°7'39.87"	99°29'48.84"
8	Nong Kum	Bo Phloi	Kanchanaburi	*S. pauperculus*	14°15'2.04"	99°30'13.32"
9	Huai Pong	Mueang	Rayong	*S. pauperculus*	12°44'0.69"	101°8'13.35"
10	Sa Krachom	Don Chedi	Suphan Buri	*S. pauperculus*	14°38'26.03"	99°54'24.34"
11	San Chao Rong Thong	Wiset Chai Chan	Ang Thong	*S. pauperculus*	14°35'57.30"	100°19'22.89"
12	Noen Kham	Noen Kham	Chai Nat	*S. pauperculus*	14°57'12.80"	99°55'4.23"
13	Pang Makha	Khanu Woralaksaburi	Kamphaeng Phet	*S. pauperculus*	15°55'30.59"	99°36'16.37"
14	Sakae Phrong	Mueang	Buri Ram	*S. pauperculus*	14°55'7.50"	103°01'5.93"
15	Kut Bot	Soeng Sang	Nakhon Ratchasima	*S. pauperculus*	14°27'59.22"	102°32'32.27"
16	Kut Bot	Soeng Sang	Nakhon Ratchasima	*S. pauperculus*	14°29'41.52"	102°32'7.48"
17	Lat Bua Khao	Sikhio	Nakhon Ratchasima	*S. pauperculus*	14°53'4.44"	101°38'40.54"
18	Klong meuang.	Chakkarat	Nakhon Ratchasima	*S. pauperculus*	14°53'30.01"	102°30'20.19"
19	Thale Bok	Don Chedi	Suphan Buri	*S. pauperculus*	14°40'9.73"	99°52'38.58"
20	Dan Chang	Dan Chang	Suphan Buri	*S. pauperculus*	14°49'35.83"	99°40'53.58"

Table1 Geographic coordinates*Stethorus* sp.survey on cassava

Locations						
Num.	Sub-district	District	Province	*Stethorus* sp.	Lat. (N)	Long. (E)
21	Dong Marum	Khok Samrong	Lop Buri	*S. pauperculus*	15°7'7.81"	100°51'5.74"
22	Niyom Chai	Sa Bot	Lop Buri	*S. pauperculus*	15°10'6.31"	100°51'55.51"
23	Khok Tum	Mueang	Lop Buri	*S. pauperculus*	14°49'59.70"	100°51'27.70"
				S. indira		
24	Wang Muang	Wang Muang	Saraburi	*S. pauperculus*	14°50'42.90"	101°6'8.21"
25	Ko Khanun	Phanom Sarakham	Chachoengsao	*S. pauperculus*	13°42'33.70"	101°23'19.70"
26	Khu Yai Mi	Sanam Chai Khet	Chachoengsao	*S. pauperculus*	13°38'41.40"	101°26'14.40"
				S. indira		
27	Wang Mai	Wang Sombun	Sa Kaeo	*S. pauperculus*	13°25'27.20"	102°2'51.20"
28	Thap Phrik	Aranyaprathet	Sa Kaeo	*S. pauperculus*	13°29'53.00"	102°19'38.90"
29	Sila	Mueang Khon Kaen	Khon Kaen	*S. pauperculus*	16°29'5.50"	102°49'15.70"
				S. siphonulus		
30	Non Sa-at	Non Sa-at	Udon Thani	*S. pauperculus*	16°55'25.40"	102°52'42.50"
				S. indira		

Table2 Number of spider mite consumed per day by *Stethorus pauperculus*(Weise).

Spider mites	Stages of spider mite[1/]		
	Eggs	Nymph	Adults
T. truncatus	115.65b	47.10	10.50b
T. kanzawai	104.50b	52.90	11.90b
O. biharensis	127.45b	55.35	13.00b
E. africanus	168.50a	55.90	18.85a
CV(%)	29.0	38.7	33.0

[1/]Mean in a column with different letter are differed at P<0.05 by LSD.

Table 3 Summary of prey consumption rates in immatures during development and daily prey consumption rates in adult female of acarophagous predator species at around 20, 25 and 30 ℃ under 16L: 8D. (Data modified from Gotoh *et al*., 2004)

Predator species	Temperature (℃)	Prey eggs consumed by immatures	Prey eggs consumed by female	Prey species[a]	Reference
Amblyseius californicus	20.0	12.9		*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
	25.0	11.5	16.2[b]	*T. urticae*	Ma & Laing, 1973
	25.0		17[c]	*T. urticae*	Castagnoli & Simon, 1999
	25.0	11.3	13.4[d]	*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
	26.1	13.2		*T. urticae*	Friese & Gilstrap, 1985
	26.1	11.3		*T. urticae*(R)	Friese & Gilstrap, 1985
	26.1		10.1[c]	*T. urticae*(R)	Friese & Gilstrap, 1982
	26.1	11.4	9.9[b]	*T. urticae*(R)	Gilstrap & Friese, 1985
	30.0	11.5		*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
A. womersleyi	20.0		9.2[e]	*T. urticae*	Hamamura, 1986
	25.0		15.7[e]	*T. urticae*	Hamamura, 1986
	30.0		25.6[e]	*T. urticae*	Hamamura, 1986
Metaseiulus occidentalis	26.1	10.4		*T. urticae*	Friese & Gilstrap, 1985
	26.1	12.6	13.6[b]	*T. urticae*(R)	Gilstrap & Friese, 1985
	26.1		14.4[b]	*T. urticae*(R)	Friese & Gilstrap, 1982
Phytoseiulus macropilis	20.0	5.5	2.1[b]	*T. urticae*	Ali, 1998
	25.0	8.4	4.4[b]	*T. urticae*	Ali, 1998
	26.0	10.3	13.0[c]	*T. tumidus*	Prasad, 1967
	30.0	6.7	4.3[b]	*T. urticae*	Ali, 1998
P. persimilis	25.0		33.7[c]	*T. urticae*(R)	Bravenboer & Dosse, 1962
	25.0		28.1[c]	*T. urticae*	Ashihara *et al*., 1978

[a]T.: *Tetranychus*; P.: *Panonychus*; *T. urticae*: green form; *T. urticae* (R): red form.

[b]Total number of prey eggs consumed during the oviposition period divided by the oviposition period in days. Ex. 838.4 eggs/16 days= 52.4 eggs/day.

[c]Not specified.

[d]Total number of prey eggs consumed during 20 days after eclosion of the adult females divided by 20 days.

[e]Number of prey eggs consumed during 5 days after eclosion of the adult females divided by 5 days.

Table 3 Summary of prey consumption rates in immatures during development and daily prey consumption rates in adult female of acarophagous predator species at around 20, 25 and 30 ℃ under 16L: 8D. (Data modified from Gotoh *et al*., 2004) (Continue)

Predator species	Temperature (℃)	Prey eggs consumed by immatures	Prey eggs consumed by female	Prey species[a]	Reference
P. persimilis	25.0	30.8		*T. urticae*	Gerlach & Sengonca, 1985
	26.1		25.0[b]	*T. urticae*(R)	Friese & Gilstrap, 1982
	26.1	14.9		*T. urticae*	Friese & Gilstrap, 1985
	26.1	13.4	25.0[b]	*T. urticae*(R)	Gilstrap & Friese, 1985
Scolothrips longicornis	25.0	61.7		*T. urticae*	Gerlach & Sengonca, 1985
	25.0	63.2		*T. urticae*(R)	Gerlach & Sengonca, 1986
	25.0	63.2	53.8[b]	*T. urticae*(R)	Sengonca & Weigand, 1988
S. sexmaculatus	18.3	55.8	16.1[b]	*T. pacificus*	Gilstrap & Oatman, 1976
	23.9	68.0	55.9[b]	*T. pacificus*	Gilstrap & Oatman, 1976
	29.4	63.9	52.4[b]	*T. pacificus*	Gilstrap & Oatman, 1976
S. takahashii	20.0		18.5[c]	*T. kanzawai*	Nakagawa, 1993
	20.0	55.1		*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
	25.0		42.6[c]	*T. kanzawai*	Nakagawa, 1993
	25.0	54.3	23.0[d]	*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
	27.0	52.4	60.9[e]	*T. urticae*	Kishimoto, 2003
	30.0		54.0[c]	*T. kanzawai*	Nakagawa, 1993
	30.0	52.9		*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
Stethorus japonicus	20.0	1,035.4		*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
	25.0	1,111.0	294.4[d]	*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
	27.0	833.8	256.8[e]	*T. urticae*	Kishimoto, 2003

[a] *T.*: *Tetranychus*; *P.*: *Panonychus*; *T. urticae*: green form; *T. urticae* (R): red form.

[b] Total number of prey eggs consumed during the oviposition period divided by the oviposition period in days. Ex. 838.4 eggs/16 days= 52.4 eggs/day.

[c] Not specified.

[d] Total number of prey eggs consumed during 20 days after eclosion of the adult females divided by 20 days.

[e] Number of prey eggs consumed during 5 days after eclosion of the adult females divided by 5 days.

Table 3 Summary of prey consumption rates in immatures during development and daily prey consumption rates in adult female of acarophagous predator species at around 20, 25 and 30 ℃ under 16L: 8D. (Data modified from Gotoh *et al*., 2004) (Continue)

Predator species	Temperature (℃)	Prey eggs consumed by immatures	Prey eggs consumed by female	Prey species[a]	Reference
Stethorus japonicus	30.0	1,096.0		*T. urticae*(R)	Gotoh *et al*., 2004
S. madecassus	20.0	570	21.0[c]	*T. neocaledonicus*	Chazeau, 1974
	25.0	491	46.8[c]	*T. neocaledonicus*	Chazeau, 1974
	29.0	490	90.0[c]	*T. neocaledonicus*	Chazeau, 1974
S. picipes	26.7	385.6		*P. citri*	Flescher, 1950
S. punctillum	22.0	250		*T. urticae*	Bravenboer, 1959
S. pauperculus	27.0		**168.5**	***E. africanus***	**Present study**
	27.0		**115.6**	***T. truncatus***	**Present study**
	27.0		**104.5**	***T. kanzawai***	**Present study**
	27.0		**127.45**	***O. biharensis***	**Present study**

[a]*T*.: *Tetranychus*; *P*.: *Panonychus*; *T. urticae*: green form; *T. urticae* (R): red form.

[b]Total number of prey eggs consumed during the oviposition period divided by the oviposition period in days. Ex. 838.4 eggs/16 days= 52.4 eggs/day.

[c]Not specified.

[d]Total number of prey eggs consumed during 20 days after eclosion of the adult females divided by 20 days.

[e]Number of prey eggs consumed during 5 days after eclosion of the adult females divided by 5 days.

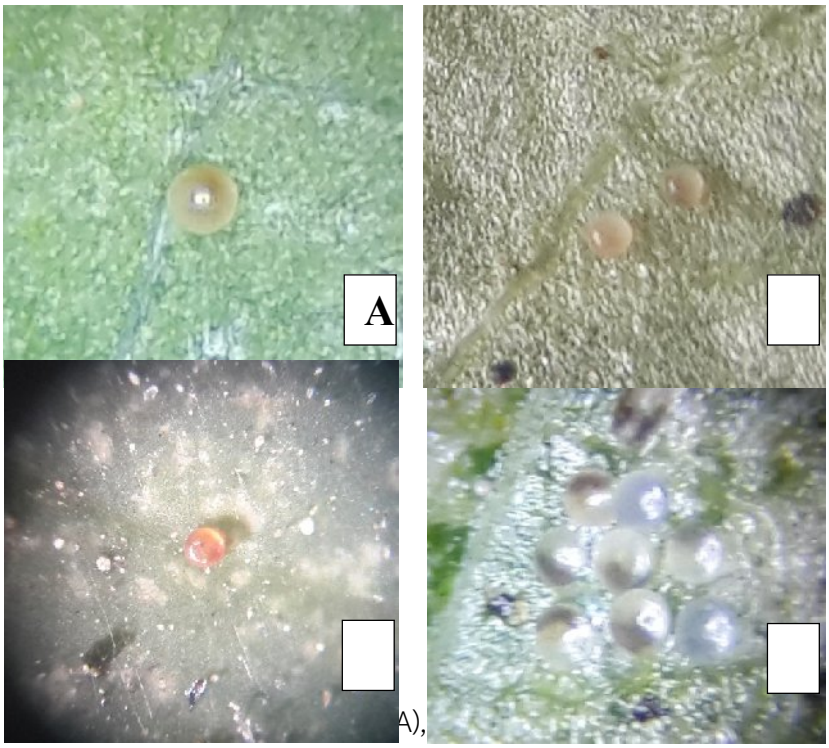


Figure 1 Egg of A), (B), *Oligonychus biharensis*(Hirst) (C) and *Eutetranychus africanus*(Tucker) (D)

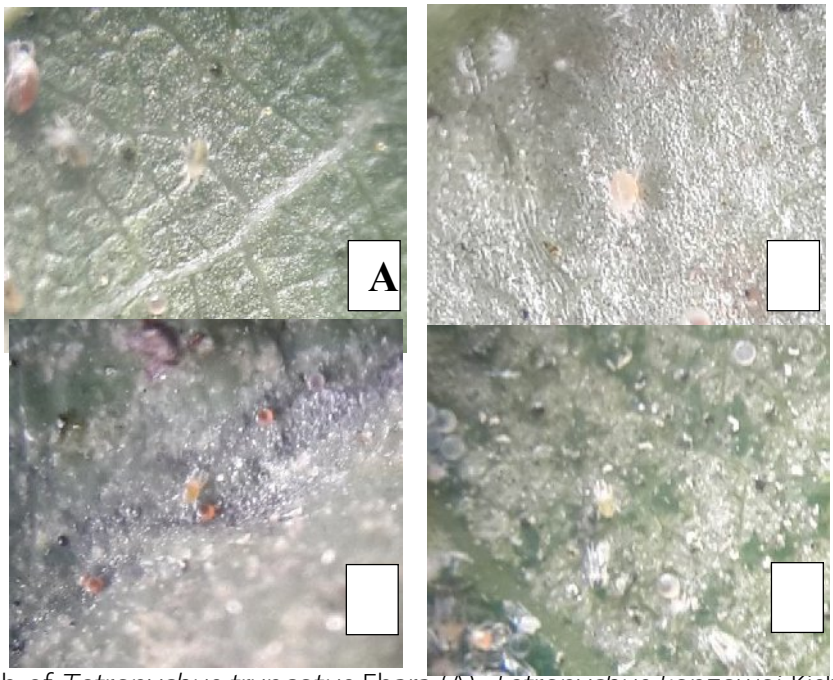


Figure 2 Nymph of *Tetranychus truncatus* Ehara (A), *Tetranychus kanzawai* Kishida (B),*Oligonychus biharensis*(Hirst) (C)and *Eutetranychus africanus*(Tucker) (D)

Figure 3adult of *Tetranychus truncatus* Ehara (A), *Tetranychus kanzawai* Kishida (B) *Oligonychus biharensis*(Hirst) (C)and *Eutetranychus africanus*(Tucker) (D)

Figure 4

Egg (A), larva (B), pupa (C) and adult (D) of *Stethorus pauperculus*(Weise).

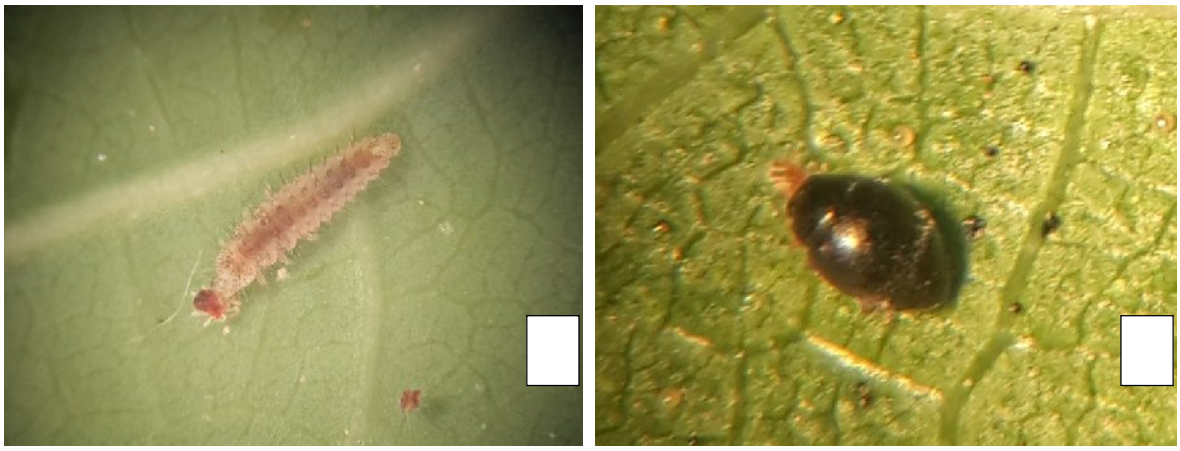


Figure 5 A larva (A) and adult (B) of *Stethorus pauperculus*(Weise) feeding on adult of prey.

การทดลองที่ 1.2.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของระยะไข่ และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider (Neuroptera:Chrysopidae)

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองการเก็บรักษาไข่ และ ดักแด้ แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ที่ 3 อุณหภูมิ 0±2 10±2 และ15 ±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับอุณหภูมิปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียสทั้ง 3 ช่วงเวลา คือเก็บที่ระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน ตามลำดับนั้น เมื่อนำมาพักที่ อุณหภูมิห้องปกติ 25± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการตรวจผล 4 สัปดาห์ พบว่าในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ในการฟักของไข่ ที่ 0±2 องศาเซลเซียส เก็บที่ 5 10 และ 15 วัน เป็น 25 , 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 10±2 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ฟักเป็น 63, 52 และ 11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 15±2 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ฟักเป็น 62,48 และ 45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ เปอร์เซ็นต์การฟักไข่แมลงช้างปีกใสที่อุณหภูมิปกติ 25±2 องศาเซลเซียส ทั้ง 3 ช่วงเวลา เป็น 98,92 และ88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลการทดลองเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ที่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเก็บรักษาไข่ไว้ที่ อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส และเก็บได้นาน 5 วัน เท่านั้นจึงจะมีการฟักเกิน 50% (ตารางที่ 1) และถ้าดูตามประโยชน์ที่จะได้จากการยืดเวลาการฟักของไข่แมลงช้างปีกใส (ตารางที่ 3) เพิ่มเวลาการฟักได้ ประมาณ 1 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับแมลงช้างปีกใสที่เลี้ยงในอุณหภูมิห้องปกติ 25± 1 องศาเซลเซียส ระยะเวลาฟัก 3-5 วัน การเก็บรักษาดักแด้ แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ที่ 3 อุณหภูมิ 0±2 10±2 และ15 ±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับอุณหภูมิปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียสทั้ง 3 ช่วงเวลา คือเก็บที่ระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน ตามลำดับนั้น เมื่อนำมาพักที่ อุณหภูมิห้องปกติ 25± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการตรวจผล 4 สัปดาห์ พบว่าในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การเป็นตัวเต็มวัย ที่ 0±2 องศาเซลเซียส เก็บที่ 5 10 และ 15 วัน เป็น 31, 0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 10±2 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์เป็น 60, 48 และ46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 15±2 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์เป็นตัวเต็มวัย 36, 45 และ 45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 2) เปรียบเทียบกับ เปอร์เซ็นต์การฟักไข่แมลงช้างปีกใสที่อุณหภูมิปกติ 25±2 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ 93,90 88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และยืดอายุการเก็บได้ ประมาณ 2 สัปดาห์ (ตารางที่3) จากผลการทดลองเปอร์เซ็นต์การเป็นตัวเต็มวัยที่เกิน 50% มีเพียงที่เก็บในอุณหภูมิ 10±2 °c ระยะเวลาเก็บ 5 วันเท่านั้น ผลของการเก็บรักษาดักแด้และเปอร์เซ็นต์การออกเป็นตัวเต็มวัยอาจจะมีผลของความสมบูรณ์ของดักแด้ที่เลือกมาทดลอง ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การออกเป็นตัวเต็มวัยต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ control

Table 1. Percentage (%) of *P. ramburi* from eggs to larva at four different constant temperature at keep on 5 10 and 15 days.

Temperature (± 2 °c)	Number of eggs used	Individuals survived time of keep (days)			Survival (%)		
		5	10	15	5	10	15
0	300	25	5	No	25	5	0
10	300	63	52	11	63	52	11
15	300	62	48	45	62	48	45
Control 25	300	98	92	88	98	92	88

Table 2. Percentage (%) of *P. ramburi* from pupal to adult at four different constant temperature at keep on 5 10 and 15 days.

Temperature (± 2 °C)	Number of pupal used	Individuals survived time of keep (days)			Survival (%)		
		5	10	15	5	10	15
0	300	31	no	no	31	no	no
10	300	60	48	46	60	48	46
15	300	36	45	45	36	45	45
Control 25	300	93	90	88	93	90	88

Table 3. Developmental period in days of egg and papal of *P. ramburi* at four different constant temperature. .

Developmental	Time of keep (days)	Tempertures (°c)			
		0±2	10±2	15 ±2	25± 2
Egg	5	10-19 days	15-20 days	no	3-5 days
	10	8-10 days	9-15 days	10-15 days	3-5 days
	15	8-10 days	10-15 days	14-20 days	3-5 days
Papal	5	10-22 days	no	no	7-10 days
	10	9-16 days	9-19 days	9-12 days	7-10 days
	15	8-20 days	9-21days	15-21 days	7-10 days

การทดลองที่ 1.2.5 ผลของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* ต่อแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider ระยะต่างๆ

ผลการทดลอง

จากผลการทดลอง ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่อัตรา 200 IJs มีผลต่อ ระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ทำให้อัตราการตายของแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* หลังจากพ่นไส้เดือนฝอย 7 วัน ที่ อุณหภูมิ 25 ± 2 °C (ตารางที่ 1) เปอร์เซ็นต์การตายเป็น 91.33% 100% 100% และ 61.33% ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนตายเป็น 91.33 ± 13.32 100 ± 0.00 100 ± 0.00 และ 61.33 ± 22.03 ตามลำดับ แสดงว่า ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อัตรา 200 IJs ต่อ มล. มีผลกับแมลงช้างปีกใสทุกระยะการเจริญเติบโต เมื่อเปรียบเทียบกับ control สอดคล้องกับการรายงานของ Kaya and Amold

(1981) รายงานว่า ไส้เดือนฝอย สามารถเข้าทำลายแมลงได้ตั้งแต่ระยะตัวอ่อน ระยะก่อนเข้าดักแด้ และระยะตัวเต็มวัยที่เพิ่งฟัก และ ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย จะดีที่สุดที่อุณหภูมิ 20 °C – 30 °C (Koppenhofer, 2000) ซึ่งในการทดลองนี้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการทดลองมี อุณหภูมิ 25 ± 2 °C มีผลทำให้ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เข้าทำลายแมลงได้ดีขึ้นด้วย Rojst *et.al* (2007) รายงานว่า สายพันธุ์ไส้เดือนฝอย อัตราที่ใช้ และอุณหภูมิ มีผลต่อแมลงศัตรูธรรมชาติ หรือแมลงนอกเป้าหมายหลายชนิด เช่น ด้วงเต่า *Adalia bipunctata* และ แมลงช้างปีกใส *Chrysoperla carnea* ได้มีงานทดลองที่ใช้ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อัตรา 2500 IJs กับ ตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใส *C carnea* ทำให้ตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใส *C carnea* ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังพ่น 4 วัน นอกจากนั้น Anes and Ganguly. (2015) ได้ศึกษาผลของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ *Steinernema thermophilum* และ *Steinernema indica* อัตรา 100 IJs กับ มด *Messor himalayanus* พบว่า ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำให้มดชนิดนี้ตาย 100% ภายใน 5 วัน เช่นกัน ผลของ เชื้อรา *B. bassiana* อัตรา $1x10^9$ cfu ต่อ มล. (ตารางที่ 1) ทำให้แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ตาย 52% 66.67% 36% และ 45.33% ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 52 ± 5.29 58.67±7.02 36.67 ± 10.07 และ 40.00 ± 10.00 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในข้อจำกัดของการใช้ที่แตกต่างกันพฤติกรรม และสภาพแวดล้อม ในสภาพธรรมชาติ ก็มีผลให้การที่ เชื้อจุลินทรีย์ ทั้ง 2 ชนิด และแมลงที่มีประโยชน์มาเจอกันน้อยมาก ดั้งนั้นในการนำไปควบคุมศัตรูพืชก็ต้องจัดช่วงเวลาในการใช้ให้เหมาะสมเพื่อได้ประโยชน์มากที่สุด

Table 1.Mean ± SE /Mortality of Green lacewing Plesiochrysa *ramburi* by Nematode *Steinernema carpocapsae* and Fungi, *Beauveria bassiana*

Treatments	Mean ± SE / % Motality of *Plesiochrysa ramburi*			
	Egg	Larva	Pupa	adult
S. carpocapsae	91.33 ± 13.32 (91.33%)	100 ± 0.00 (100%)	100 ± 0.00 (100%)	61.33 ± 22.03 (61.33%)
B. bassiana	52 ± 5.29 (52%)	58.67±7.02 (58.67%)	36.67 ± 10.07 (36.67%)	40.00 ± 10.00 (40%)
Control	0.00 0.00	0.00 0.00	15.00 ± 5.57 (15%)	20.00 ± 5.57 (20%)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ(Conclusion and Suggestion)

กิจกรรมย่อยที่ 1.1 การควบคุมแมลงหวี่ขาวโดยชีววิธี

การทดลองที่ 1.1.1 เทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้แตนเบียนสกุล *Encarsia* เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว

สรุปผลการทดลอง

แมลงหวี่ขาวที่พบบนมันสำปะหลังมี 2 ชนิด ได้แก่ แมลงหวี่ขาวใยเกลียว *Aleurodicus disperses* Russell และแมลงหวี่ขาวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) พบแตนเบียนสกุล *Encarsia* ออกจากตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียว จำนวน 2 ชนิด ชนิดลำตัวสีดำและชนิดลำตัวสีเหลือง ยังไม่สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้ ออกจากตัวอ่อนวัย 3 และดักแด้แมลงหวี่ขาวใยเกลียวที่เก็บมาจากแปลงมันสำปะหลัง มีอัตราการเบียน 0-77.42% โดยพบมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน แมลงหวี่ขาวใยเกลียวมีการระบาดในแปลงมันสำปะหลัง ในเดือนตุลาคม และพฤศจิกายน เริ่มลดลงในเดือนธันวาคม และพบแมลงหวี่ขาวได้น้อยมากจนถึงสิงหาคม และเริ่มพบการวางไข่และจำนวนประชากรแมลงหวี่ขาวมากขึ้นในเดือนกันยายน

การเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวบนต้น ฝรั่ง มันสำปะหลัง และต้นคริสต์มาส ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าปริมาณแมลงหวี่ขาวที่เลี้ยงได้ มีการเปลี่ยนแปลงทำนองกับปริมาณแมลงหวี่ขาวที่พบในสภาพแปลงมันสำปะหลัง กล่าวคือ ระหว่างเดือน มกราคม ถึงสิงหาคม บางช่วงระยะเวลาไม่สามารถเพิ่มปริมาณแมลงหวี่ขาวได้มากพอ ที่จะทดลองการเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Encarsia* sp.

แตนเบียน *Encarsia* sp. ชนิดสีดำ ที่เลี้ยงด้วยตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นตำแยแมว มีวงจรชีวิต 19 วัน และทดสอบการเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวที่เลี้ยงบนใบฝรั่ง เบื้องต้นพบว่า แตนเบียนชอบเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาววัย 3 มากที่สุด แต่อัตราการเบียนยังต่ำอยู่ระหว่าง 0-36.11% มีวงจรชีวิต 15-30 วัน เฉลี่ย 21.49 วัน

ในการเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Encarsia* sp. ชนิดสีดำ ด้วยตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวบนต้นฝรั่ง โดยเพาะเลี้ยงตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวบนต้นฝรั่ง จากนั้นใช้ถุงพลาสติกที่เจาะช่องแล้วติดด้วยผ้าตาข่ายไนล่อนชนิดละเอียดหุ้มใบฝรั่งที่มีตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว ปล่อยแตนเบียน *Encarsia* sp. เข้าไป ให้แตนเบียนลงเบียนตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว จากนั้นปล่อยทิ้งไว้ เฝ้าสังเกตจนพบแตนเบียนตัวเต็มวัยรุ่นใหม่ออกจากแมลงหวี่ขาวที่ใช้เพาะเลี้ยง ในห้องปฏิบัติการสามารถเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Encarsia* sp. ได้เบื้องต้น แต่ยังไม่สามารถผลิตขยายเป็นปริมาณมากได้

ระหว่างเดือน มกราคม ถึง สิงหาคม พบแมลงหวี่ขาวในแปลงน้อยมาก และบางช่วงระยะเวลาไม่สามารถเพิ่มประชากรแมลงหวี่ขาวที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการได้มากพอ ทำให้การทดลองการเพาะเลี้ยงแตนเบียนไม่สามารถดำเนินการได้ตามแผน

การทดลองที่ 1.1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของแมลงช้างปีกใสในการควบคุมแมลงหวี่ขาวใยเกลียว

สรุปผลการทดลอง

ตัวอ่อนแมลงช้างปีกใส *M. basalis P. ramburi* และ *C. carner* ระยะตัวอ่อนวัย 1 วัย 2 และวัย 3 สามารถกินไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ 86.15 ± 16.64, 175.70 ± 28.57, 254.85 ± 36.87 และ 71.60 ± 12.72, 144.45 ± 23.59, 302.10 ± 51.94 และ 48.00±13.23 84.05 ±12.67 152.80 ± 39.3 ฟอง ตามลำดับ รวมตลอดระยะตัวอ่อนของแมลงช้างปีกใสสามารถทำลายไข่แมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้เฉลี่ย 526.2 ± 47.35 518.15±6.06 และ282.90± 48.06 ฟอง ตามลำดับสามารถกินตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้ 25.75 ± 7.81 66.75 ± 14.97 84.70 ± 54 .44 ,37.30 ± 8.24 89.75 ± 36.75 205.20 ± 50.99 และ

22.4 ± 9.86 36.8±7.53 96.8±12.061ตัว ตามลำดับ ทำลายตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวใยเกลียวได้เฉลี่ย 277.2 ± 59.46 332.25 ± 81.43 และ 96.8 ± 12.061 ตัวตามลำดับ การเลือกใช้แมลงช้างปีกใสชนิดใดคงต้องขึ้นอยู่กับการผลิตว่าชนิดใดสามารถผลิตได้ปริมาณมาก และง่ายที่สุด

กิจกรรมย่อยที่ 1.2 การผลิตและการใช้แมลงและไรควบคุมศัตรูพืช

การทดลองที่ 1.2.1 พัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาต *Sycanus versicolor* Dohrn

สรุปผลการทดลอง

พัฒนาการผลิตมวนเพชฌฆาตศึกษา 4 หัวข้อ คือ

1. ผลของอาหารได้แก่หนอนนก, ดักแด้หนอนนก, หนอนกระทู้ผัก และหนอนนกรวมกับดักแด้หนอนนก ที่มีต่อการเจริญเติบโตของมวนเพชฌฆาต สรุปได้ว่าดักแด้หนอนนกเป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับใช้ผลิตขยายมวนเพชฌฆาตเพราะทำให้มวนเพชฌฆาตเจริญเติบโตดีที่สุดโดยสามารถผลิตไข่ได้เฉลี่ย 5 กลุ่ม / ตัว มีจำนวนไข่ทั้งหมดเฉลี่ย 534.6 $\pm$ 67.6 ฟอง/ตัว และไข่มีเปอร์เซ็นต์ฟัก 85.8 $\pm$ 6.1%

2. จำนวนที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงขยายมวนเพชฌฆาตในระยะตัวอ่อนและระยะตัวเต็มวัยสรุปได้ว่าจำนวนที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงขยายมวนเพชฌฆาตในระยะตัวอ่อนคือ 100 และ 150 ตัวต่อกล่อง เพราะมวนสามารถเป็นตัวเต็มวัยมากที่สุด 73.5 และ 78.3 % ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ และจำนวนที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงขยายมวนเพชฌฆาตในระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ต่อเพศเมียคือ 40 : 40 คู่ต่อกล่อง เพราะมวนสามารถวางไข่ได้มากที่สุด 5.17 กลุ่มต่อตัว หรือ 428.97 ฟอง/ตัว

3. การเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 และดักแด้หนอนนก (เหยื่ออาหาร) สรุปได้ว่าการเก็บรักษาตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 1 สัปดาห์ เพราะทำให้ตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 มีชีวิตรอดมากที่สุด 86.00 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการเก็บนาน 0 สัปดาห์ (ที่อุณหภูมิห้อง) แต่ถ้าเก็บตัวอ่อนมวนเพชฌฆาตวัย 4 ที่อุณหภูมิ 13.73 $\pm$ 0.29 องศาเซลเซียส จะสามารถเก็บได้นาน 2 สัปดาห์ เพราะทำให้มวนเพชฌฆาตมีชีวิตรอดมากที่สุด 80.00 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการเก็บนาน 0 สัปดาห์ (ที่อุณหภูมิห้อง) สำหรับการเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุ 2 และ 3 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 4 สัปดาห์ เพราะทำให้ดักแด้หนอนนกมีชีวิตรอดมากที่สุดคือ 100 และ 97.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างทางสถิติกับการเก็บที่อุณหภูมิห้อง แต่ถ้าเก็บดักแด้หนอนนกที่มีอายุตั้งแต่ 4, 5 และ 6 วัน ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 10.09 $\pm$ 0.34 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานเพียง 1 สัปดาห์ เพราะทำให้ดักแด้หนอนนกมีชีวิตรอดมากที่สุด 93.50 - 95.50 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่แตกต่างทางสถิติกับการเก็บที่อุณหภูมิห้อง

4. การผลิตมวนระยะตัวอ่อนจำนวน 150 ตัวต่อกล่อง ใช้ดักแด้หนอนนกและหนอนนกจำนวน 1,114.10 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 7.13 บาท และการผลิตมวนตลอดชีวิต โดยเริ่มจากการเลี้ยงมวนระยะตัวอ่อนจำนวน 150 ตัวต่อกล่อง จนตัวเต็มวัยตาย ใช้ดักแด้หนอนนกและหนอนนกจำนวน 1,886.10 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 12.01 บาท สำหรับการผลิตมวนเพชฌฆาตระยะตัวเต็มวัยเพศผู้ : เพศเมีย จำนวน 40 : 40 ตัวต่อกล่อง ใช้หนอนนกจำนวน 908.80 ตัว ใช้ต้นทุนการผลิตเฉพาะอาหาร 5.82 บาท

การทดลองที่ 1.2.2 พัฒนาการเพาะเลี้ยงและศักยภาพการเป็นตัวห้ำของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis epius* (Lepidoptera:Lycaenidae)

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาการเพาะเลี้ยง และศักยภาพการเป็นตัวห้ำของผีเสื้อตัวห้ำ *Spalgis* epius ได้ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมผีเสื้อตัวห้ำจากแหล่งที่มีการระบาดของเพลี้ยแป้ง ระหว่าง เดือนธันวาคม 2554 ถึง กันยายน 2555 พบผีเสื้อตัวห้ำ *S.* epius ในระยะตัวเต็มวัย 5 ตัว เพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 4 ตัว ระยะตัวหนอน จำนวน 172 ตัว และระยะดักแด้ จำนวน 37 ดักแด้ ในพืช 6 ชนิด คือ มันสำปะหลัง น้อยหน่า ชบา มะเขือยาว มะม่วง และวัชพืช สำรวจใน 2 จังหวัด คือ นครราชสีมา และนครปฐม ศึกษาชีววิทยาของ ผีเสื้อตัวห้ำ *S. epius* ระยะไข่ มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีเขียวอ่อน ใกล้ฟักจะค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ไข่มีอายุ 3-5 วัน ระยะตัวอ่อน มี 4 ระยะ ตัวอ่อนมีอายุ 11 - 15 วัน ระยะก่อนเข้าดักแด้ จะมีลักษณะเหมือนตัวอ่อนระยะที่ 4 แต่ไม่เคลื่อนไหว มีระยะเวลาประมาณ 1-2 วัน ระยะดักแด้ มีอายุประมาณ 8 -12 วัน ตัวเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางวันขนาดเล็ก ค่าเฉลี่ยระยะไข่ ระยะตัวหนอน (มี 4 ระยะ) ระยะก่อนเข้าดักแด้ และระยะดักแด้ เป็น 4.2 ± 0.77 11.45 ± 1.32 1 ± 0.18 และ 8 ± 0.79 วันตามลำดับ ตัวเต็มวัย รวมระยะไข่ถึงระยะดักแด้เฉลี่ย 24.72 ± 2.04 ประมาณ 22-29.5 วัน

การทดลองที่ 1.2.3 ชนิดและศักยภาพการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ*Stethorus* spp.ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชบนมันสำปะหลัง

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาชนิดและศักยภาพการกินของด้วงเต่าตัวห้ำ *Stethorus* spp. ศัตรูธรรมชาติของไรศัตรูพืชบนมันสำปะหลังพบเป็นด้วงเต่าตัวห้ำในสกุล *Stethorus* 3 ชนิด คือ*Stethorus pauperculus* (Weise), *Stethorusindira* Kapur และ *Stethorus siphonulus* Kapurอยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Coccinellidae วงศ์ย่อย Scymninaeและพบว่าด้วงเต่าตัวห้ำ *S. pauperculus* มีศักยภาพการกินไรศัตรูพืชทุกระยะ จึงเหมาะสมที่จะเพาะเลี้ยงด้วงเต่าชนิดนี้ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดไรศัตรูมันสำปะหลังและไรศัตรูพืชอื่นๆต่อไป

การทดลองที่ 1.2.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญเติบโตของระยะไข่ และระยะดักแด้ของแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider (Neuroptera:Chrysopidae)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองการเก็บรักษาไข่ และ ดักแด้ แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ที่ 3 อุณหภูมิ 0±2 10±2 และ15 ±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับอุณหภูมิปกติ 25 ± 2 องศาเซลเซียสทั้ง 3 ช่วงเวลา คือเก็บที่ระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน ตามลำดับนั้น เมื่อนำมาพักที่ อุณหภูมิห้องปกติ 25± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาในการตรวจผล 4 สัปดาห์ พบว่าในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ ดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์ในการฟักของไข่ ที่ 0±2 องศาเซลเซียส เก็บที่ 5 10 และ 15 วัน เป็น 25 , 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 10±2 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ฟักเป็น 63, 52 และ 11 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 15±2 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ฟักเป็น 62, 48 และ 45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ เปอร์เซ็นต์การฟักไข่แมลงช้างปีกใสที่อุณหภูมิปกติ 25±2 องศาเซลเซียสเป็น 98, 92 และ 88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ที่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเก็บรักษาไข่ไว้ที่ อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส และเก็บนาน 5 วัน การเก็บรักษาดักแด้ แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* มีเปอร์เซ็นต์การเป็นตัวเต็มวัย ที่0±2 องศาเซลเซียส เก็บที่ 5 10 และ 15 วัน เป็น 31, 0 และ 0

เปอร์เซ็นต์ และที่อุณหภูมิ 10±2 องศาเซลเซียส เป็น 60, 48 และ46 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 15±2 องศาเซลเซียส เป็น 36, 45 และ 45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ เปอร์เซ็นต์การเป็นตัวเต็มวัยของแมลงช้างปีกใสที่อุณหภูมิปกติ 25±2 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์ 93,90 88 เปอร์เซ็นต์ เก็บดักแด้ที่อุณหภูมิ 10±2 จะมีเปอร์เซ็นต์การเป็นตัวเต็มวัยดีที่สุด ยืดอายุการเก็บได้ ประมาณ 2 สัปดาห์

การทดลองที่ 1.2.5 ผลของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* และเชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* ต่อแมลงช้างปีกใส *Plesiochrysa ramburi* Schneider ระยะต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่อัตรา 200 IJs มีผลต่อ ระยะไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัยแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ทำให้อัตราการตายของแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* หลังจากพ่นไส้เดือนฝอย 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 ^{o}C ตามตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายเป็น 91.33% 100% 100% และ 61.33% ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ยจำนวนตายเป็น 91.33 ± 13.32 100 ± 0.00 100 ± 0.00 และ 61.33 ± 22.03 ตามลำดับ เชื้อรา *B. bassiana* อัตรา 1x10^{9} cfu ต่อ มล. ทำให้แมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ตาย 52% 66.67% 36% และ 45.33% ตามลำดับ คิดเป็น ค่าเฉลี่ย 52 ± 5.29 58.67±7.02 36.67 ± 10.07 และ 40.00 ± 10.00 ตามลำดับ ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อัตรา 200 IJs ต่อ มล. และเชื้อรา *B. bassiana* อัตรา 1x10^{9} cfu ต่อ มล. มีผลกับแมลงช้างปีกใส *P. ramburi* ทุกระยะการเจริญเติบโต เมื่อเปรียบเทียบกับ Control อย่างไรก็ตามในข้อจำกัดของการใช้ที่แตกต่างกัน และในสภาพธรรมชาติ ที่ตัวของแมลงช้างปีกใสอาจจะเคลื่อนที่หรือหนีจากแหล่ง ที่มีการใช้ ไส้เดือนฝอยหรือเชื้อราได้ การที่จะมาเจอกันอาจจะน้อยมาก ผลกระทบก็จะลดลงไม่สูงมากเหมือนในสภาพห้องปฏิบัติการ

กิจกรรมที่ 2 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช
Mass Production and Utilization of Microorganisms and Entonopathogenic Nematode for Pest Control

ผู้วิจัย

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรส เทียนทัด ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ วิไลวรรณ เวชยันต์ สาทิพย์ มาลี พัชรีวรรณ มณีสาคร นันทพัช พินศรี รัตนา นชะพงศ์ เมธาสิทธิ์ คนการ อัมพร วิโนทัย

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คำสำคัญ(key word)

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี, ศัตรูธรรมชาติ, การผลิต, ชีวภัณฑ์, แบคทีเรีย, บีที, *Bacillus thuringiensis* , ไวรัสโรคแมลง, ไวรัส NPV, ราเขียวเมตาไรเซียม; *Metarhizium anisopliae* ,ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ,*Steinernema riobrave* ,*Steinernema glaseri* ,เซลล์เพาะเลี้ยง, Microencapsulation, เชื้อราบิวเวอเรีย; *Beauveria bassiana*, Nucleopolyhedrovirus ,Cryopreservation

บทคัดย่อ (Abstracts)

การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการนำไวรัส NPV BT เชื้อราแมลง และไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยครอบคลุมการศึกษาข้อมูลพื้นฐานและประยุกต์ ที่นำไปสู่การเลี้ยงขยายให้มีปริมาณมาก และวิธีการนำไปใช้ควบคุมศัตรูพืช ดำเนินการระหว่าง ระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2558 โดยมีการทดลองทั้งสิ้น 20 การทดลอง เป็นงานวิจัยด้านการใช้ไวรัสควบคุมแมลงศัตรูพืชจำนวน 6 การทดลอง งานวิจัยด้านการใช้ BT ควบคุมแมลงศัตรูพืชจำนวน 4 การทดลอง งานวิจัยด้านการใช้เชื้อราแมลงควบคุมแมลงศัตรูพืชจำนวน 4 การทดลอง และงานวิจัยด้านการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืชจำนวน 6 การทดลอง ดำเนินการทดลองในห้องปฏิบัติการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และในแปลงปลูกพืชของเกษตรกรในจังหวัดต่าง ๆ

งานวิจัยด้านการใช้ไวรัสควบคุมแมลงศัตรูพืช ศึกษาการผลิตไวรัส NPV โดยเซลล์เพาะเลี้ยง พัฒนาสูตรไวรัส NPV เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ชนิดต่างๆด้วยเทคนิค Microencapsulation การเก็บรักษาและการนำไปใช้ร่วมกับ BT ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

งานวิจัยด้านการใช้ BTควบคุมแมลงศัตรูพืช ศึกษาการผลิตขยาย BT ด้วยวิธีต่างๆ ศึกษาผลกระทบของสารเคมีทางการเกษตรต่อ BT และระดับความต้านทานของแมลงต่อ BT

งานวิจัยด้านการใช้เชื้อราแมลงควบคุมแมลงศัตรูพืชการคัดเลือก การผลิตขยาย เชื้อราบิวเวอเรีย *Beauveria bassiana* (Balsamo) และราเขียวเมตาไรเซียม *Metarhizium anisopliae* และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงหมัดผักและแมลงหวี่ขาว

งานวิจัยด้านการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช ศึกษาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*, *S.graseri* การทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยควบคุม ด้วงหมัดผัก และหนอนเจาะดอกมะลิ และวิธีการและปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

บทนำ (Introduction)

การใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลงเป็นสารชีวินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ได้แพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สหภาพโซเวียต อินเดีย จีน ญี่ปุ่น แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกา เป็นต้น บางชนิดได้มีการผลิตเป็นการค้า เนื่องจากควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีและมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้ไวรัสมีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง (Entwistle, 1998) สำหรับในประเทศไทย นับแต่ปี พ.ศ. 2510 มีรายงานการศึกษาวิจัยโรคไวรัส NPV สาเหตุโรคของแมลง ในกลุ่ม Nucleopolyhedrovirus (NPV) หรือชื่อเดิม Nuclear polyhedrosis viruses (อุทัย, 2544) โดย กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตขยายและการใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลง ชนิด *Spodoptera exigua* Multiple-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) เป็นปริมาณมากในรูปแบบการผลิต แบบ *in vivo* คือ ผลิตจากหนอนแมลง เนื่องจาก ไวรัสจะสามารถเจริญขยายเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น การผลิตไวรัสจึงสามารถผลิตขยายได้ 2 รูปแบบ คือ การผลิตจากหนอนแมลง เรียกว่าแบบ *in vivo* และ ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง เรียกว่า แบบ *in vitro* (สุชลวัจน์, 2545; Wongwilikhit and Somsuk, 2006) ปัญหาที่พบในการผลิตไวรัส SeMNPV ที่ใช้รูปแบบการผลิต แบบ *in vivo* คือ 1.) อัตราการผลิตไวรัสแต่ละรุ่น/ชนิดไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากเลี้ยงหนอนไม่ได้ตามกำหนดเวลาที่ต้องการใช้แต่ละรุ่น 2.) ประสิทธิภาพไม่แน่นอน มีกลิ่นเหม็น เนื่องจากมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว รา ทั้งที่เป็นสาเหตุโรคแมลงหรือแม้แต่ไวรัสที่ต่างชนิดกัน และผลิตภัณฑ์ไวรัสไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางสรีรวิทยา 3.) ผลิตภัณฑ์ไวรัสที่มีจำหน่ายทุกวันนี้ ยังไม่สามารถกำหนดมาตรฐานในการขึ้นทะเบียนสารชีวินทรีย์ตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ เพียงแต่ให้ใช้แบบไม่มีการขึ้นทะเบียนฯเท่านั้น 5.) การใช้สถานที่และแรงงานในการปฏิบัติงานมาก ซึ่งทำให้มีต้นทุนสูง และทำให้มีข้อจำกัดในกระบวนการผลิตขยายในปริมาณมาก (อุทัยและคณะ, 2537) การแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นของการผลิตไวรัส SeMNPV แบบ *in vivo* จึงมีการทดลองวิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง หรือที่เรียกว่า การผลิตแบบ *in vitro* โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช จาก United Stated Department of Agriculture (USDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา (สุชลวัจน์, 2539; สุชลวัจน์และคณะ, 2543; Lynn and Shapiro, 1998) มาใช้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนแมลงสายพันธุ์ไทยในกลุ่มแมลงศัตรูพืชผัก ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทย (Sl cell line : *Spodoptera litura* cell line) จากเอ็มบริโอ (Embryonic stem cell) ได้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดนี้ได้เป็นผลดี มีอัตราการเจริญ 91.49 % (สุชลวัจน์และคณะ, 2545) ต่อมาใช้เทคนิคเดียวกันเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมมีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ 90.91 % และได้เป็นรูปแบบการผลิตขยายไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องกันได้ดี (สุชลวัจน์และคณะ, 2551) ดังนั้น จึงทำการวิจัยพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้เทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดใหม่เพิ่มเติม ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้เทคโนโลยีที่สามารถนำไปขยายผลในเชิงการค้าได้ และทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีคุณภาพมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ ในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีสอดคล้องกับแนวทางการผลิตพืชให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตและการพัฒนาที่ยั่งยืนตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554)

เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ ทดแทนตัวหนอนทดลองในการผลิตไวรัสโรคแมลงเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีกลิ่นเหม็น ทำให้คุณภาพสม่ำเสมอและมีมาตรฐานความปลอดภัย เป็นเทคโนโลยีการผลิตที่เหมาะสมอีกวิธีการหนึ่ง ที่สามารถพัฒนาไปใช้ในการผลิต

ไวรัสโรคแมลงชนิดอื่นๆ ได้ในทำนองเดียวกัน จึงต้องมีการพัฒนาการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบเพื่อให้มีไว้ใช้งานได้อย่างต่อเนื่อง และเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงได้อย่างเป็นระบบ การนำเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) นอกจากนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตไวรัส NPV เพื่อใช้เป็นสารชีวินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้ว (Entwisetle, 1998; สุดาวรรณ, 2542; สุชลวัจน์และคณะ, 2551) ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยอื่นๆได้อีกมาก เช่น การทดสอบสารพิษของรา (Vey *et al*., 1993) การทำสูตรอาหารเทียมเพาะเลี้ยงแตนเบียน *Trichogramma sp.* (Notarte and Merritt, 2001) การทดลองการเกิดโรคไวรัสในเซลล์ (สุชลวัจน์และคณะ, 2551) เป็นต้น และมีการเก็บรักษาและเพาะเลี้ยงเซลล์ได้อย่างประสิทธิภาพ (Lynn, 2001)

เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตไวรัสซึ่งเป็นชีวินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบจะต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ต่อเนื่อง ที่มีทั้งคุณภาพและประสิทธิภาพ นานเป็นปี และต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงให้อาหารทุกสัปดาห์ ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเพื่อประหยัดเวลา ค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยง และเก็บรักษาเซลล์ต้นแบบเพื่อให้มีไว้ใช้อย่างต่อเนื่อง โดยที่ไม่ต้องตั้งต้นเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นแบบทุกครั้ง สามารถยืดระยะเวลาช่วงชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงได้นานขึ้น และมีความหลากหลายในชนิดของเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ นอกจากนี้ ในต่างประเทศมีการผลิตเซลล์ขายเพื่อการค้าในรูปแช่แข็งซึ่งมีราคาสูงมาก ดังนั้น จึงควรมีการทดลองวิจัยหารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อประหยัดค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานวิจัยภายในประเทศ และมีแนวทางที่ผลิตเซลล์เพื่อการค้าได้อีกด้วย

การผลิตชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี นอกจากต้องผลิตเชื้อให้มีความเข้มข้นและมีคุณภาพตรงตามมาตรฐานแล้ว ยังต้องคำนึงถึงสูตรสำเร็จรูปก่อนบรรจุในบรรจุภัณฑ์เพื่อนำไปวางจำหน่ายหรือแจกจ่าย เนื่องไวรัส เอ็นพีวี ผลิตจากตัวหนอนซึ่งเป็นแมลงอาศัยโดยตรง ประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี จะคงที่อยู่ได้นานเพียงใดขึ้นอยู่กับการทำสูตรสำเร็จ (formulation) ซึ่งโดยหลักการผลิตจุลินทรีย์กำจัดแมลงนั้น จุลินทรีย์ที่ผลิตได้ควรเก็บไว้ได้นานเกินกว่า 12 เดือน (Hunter-Fujita *et al.,*1998) ดังนั้นการพัฒนาส่วนผสมต่างๆของไวรัส เอ็นพีวีนี้ จึงมีวัตถุประสงค์หลายประการ อาทิ เพิ่มประสิทธิภาพให้กับเชื้อเมื่อนำไปฉีดพ่นในสภาพไร่ และชลอการเสื่อมสภาพของชีวผลิตภัณฑ์ให้มีอายุการเก็บยาวนานขึ้น ประการสำคัญ เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศร้อนชื้น ทำให้ชีวผลิตภัณฑ์เสื่อมสภาพได้ง่าย การวิจัยเพื่อพัฒนาสูตรสำเร็จเพื่อให้เก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ในสภาพอากาศร้อนในประเทศไทยจึงมีความสำคัญมากกว่าประเทศที่มีอากาศเย็นอย่างในยุโรปและอเมริกา รูปแบบการทำสูตรสำเร็จที่เหมาะสมของแต่ละชนิดจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมมีส่วนสำคัญต่อการเก็บรักษาและต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ (ทิพย์วดี, 2549) การใช้ Mixture design เพื่อพัฒนาหาสูตรที่เหมาะสม โดยเฉพาะกรณีส่วนผสมที่มีมากกว่า 1 ชนิด เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการหาส่วนผสมที่มีหลายชนิด โดยเฉพาะเมื่อส่วนผสมมีการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วน ส่วนผสมที่เหลือย่อมมีการเปลี่ยนแปลงด้วย และผลรวมทั้งหมดจะเท่ากับ 1 หรือ 100 เปอร์เซ็นต์ (ศิริลักษณ์, 2533) ดังนั้นชีวผลิตภัณฑ์ที่พัฒนาสูตรสำเร็จรูปนี้ จะช่วยให้การใช้ชีวผลิตภัณฑ์เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชไม่ลดลง เพิ่มศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเมื่อเทียบกับสูตรดั่งเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการรักษาปกป้องผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะต่อการเพิ่มผลผลิตเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออก เนื่องจากเกษตรกรคุ้นเคยกับการใช้สารเคมีกำจัดแมลงมานานมากกว่า 30 ปี เพราะออกฤทธิ์เร็ว และควบคุมความเสียหายจากแมลงศัตรูพืชได้

ทันต่อเหตุการณ์ ปัจจุบันจึงพบว่าแมลงศัตรูพืชที่เป็นปัญหาสำคัญหลายชนิด สามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง เป็นผลทำให้เกษตรกรต้องพ่นสารฆ่าแมลงบ่อยครั้งขึ้น ใช้ชนิดของสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น และใช้สารฆ่าแมลงหลายชนิดพ่นพร้อมๆ กันในคราวเดียว ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้สารฆ่าแมลง และสารฆ่าแมลงเหล่านี้ยังเป็นพิษตกค้างบนผลิตผล เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีต่อสุขภาพของประชากร ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและผลเสียต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ กรมวิชาการเกษตรจึงได้ค้นคว้าวิจัยนำจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง โดยการค้นคว้าวิจัยไวรัสชนิด Nucleopolyhedrovirus (NPV) ที่พบในประเทศไทยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดแมลงต่อไป จุลินทรีย์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูง มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย จึงปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์ มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมสูง และเป็นที่ยอมรับในประเทศที่พัฒนาแล้วว่าไวรัส NPV เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นหลักร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดอื่นๆ ที่เหมาะสมในระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated Pest Management) กรมวิชาการเกษตรได้มีนโยบายที่จะสร้างความปลอดภัย ลดการปนเปื้อนและผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ด้วยการหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยที่คุณภาพและผลผลิตไม่ลดลงและไม่เพิ่มต้นทุนการผลิต (กรมวิชาการเกษตร, 2542; Matthews,1984) แต่การใช้ไวรัสก็มีข้อจำกัดอยู่บางประการ จากการเสื่อมจากสภาพอากาศที่ร้อนมีแสงแดด โดยเฉพาะรังสียูวีบีในแสงแดดเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการลดประสิทธิภาพของเชื้อ จึงได้มีความพยายามที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อให้คงทนต่อสภาพแดดจัดในบ้านเรา ด้วยการผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ รวมถึงเทคนิคการเคลือบอนุภาคด้วยสารเคมีป้องกันแสงยูวี เพื่อให้อนุภาคไวรัสอยู่ได้นานขึ้นในสภาพไร่ (ทิพย์วดี, 2549; อุทัย, 2537; Herbert,1999)

หนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้ยาสูบ เดิมพบระบาดเป็นครั้งคราวในไร่ข้าวโพด ทำความเสียหายในขณะข้าวโพดยังเล็กอยู่ และเป็นศัตรูสำคัญของฝ้ายและยาสูบในประเทศไทย แต่ปัจจุบันนี้หนอนกระทู้ผักมีความสำคัญมากและมีแนวโน้มจะระบาดรุนแรงในอนาคต เนื่องจากเป็นหนอนผีเสื้อกลางคืนที่มีขนาดกลาง 3 - 4 เซนติเมตร แม่ผีเสื้อวางไข่เป็นกลุ่มนับร้อยฟอง เมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม และเริ่มแยกย้ายออกจากกลุ่มไปทำลายส่วนต่าง ๆ ของพืช ในพืชผักสามารถทำลายได้ทุกส่วนของพืช (กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ, 2542) นอกจากนี้ยังพบระบาดในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ฝ้าย พริก ผักตระกูลกะหล่ำ ทานตะวัน ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ละหุ่ง ข้าว ข้าวโพด ยาสูบ ส้ม สตรอเบอร์รี่ กุหลาบ มันเทศ มะเขือเทศ เป็นต้น (กองกีฏและสัตววิทยา, 2544) ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานว่าหนอนผีเสื้อชนิดนี้เข้าทำลายในพืชเศรษฐกิจมากกว่า 80 ชนิด (Okada, 1981) และที่สำคัญหนอนกระทู้ผัก ซึ่งเป็นหนอนในสกุล *spodoptera* จัดว่าเป็นแมลงในสกุลที่มีความสามารถในการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็วและดีที่สุดเมื่อเทียบกับแมลงในสกุลอื่น (El-Guindy *et al*., 1982) ไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้ผักจัดอยู่ในวงศ์ *Baculoviridae* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคเฉพาะกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังใน phylum Arthropod เท่านั้น (Murphy *et al*.,1995) ในประเทศไทยพบไวรัสเอ็น พี วี หนอนกระทู้ผัก (SINPV) ครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2535 ที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี โดยคุณอุทัย เกตุนุติ นักกีฏวิทยา กรมวิชาการเกษตร และนำไวรัสดังกล่าวมาเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและศึกษาวิจัยเรื่อยมา ปัจจุบันพบว่าสามารถใช้กำจัดหนอนกระทู้ผักได้เป็นอย่างดีในสภาพไร่ และเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการแนะนำให้ใช้ในการ

ควบคุมหนอนกระทู้ผักในพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้มีการผลิตขยายไวรัสเอ็นพี วี หนอนกระทู้ผักภายในโรงงานต้นแบบการผลิตไวรัส เอ็น พี วี ควบคุมแมลงศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร

โดยหลักการแล้วไวรัส NPV จะทำให้ตัวอ่อนของแมลงในตระกูลผีเสื้อตายจากการเกิดโรคและเกิดการแพร่ระบาดไปสู่ประชากรของหนอน โดยการถ่ายทอดไปทางไข่ของแม่ผีเสื้อ ดังนั้นการผลิตไวรัสต้องแยกอาคารที่ผลิตแมลงอาศัยออกจากอาคารที่ผลิตขยายเชื้อไวรัส แต่เนื่องจากมีพื้นที่จำกัดทำให้ต้องเลี้ยงแมลงอาศัยและผลิตขยายเชื้อไวรัสในอาคารเดียวกันแต่แยกชั้น ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิตขยายเชื้อไวรัสจึงมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวซึ่งสามารถถ่ายทอดโรคโดยผ่านทางไข่ เริ่มแสดงอาการในหนอนรุ่นที่ 2 และเกิดการระบาดรุนแรงในหนอนรุ่นที่ 3 ทำให้ผลผลิตไวรัส NPV ที่ได้มีการปนเปื้อนสปอร์ของโปรโตซัว ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพของไวรัสที่ผลิตได้ (อุทัย และคณะ, 2543) การผลิตไวรัส SlNPV ในเชิงพาณิชย์ ยังประสบปัญหาของการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัว (*Nosema* sp.) ในระบบการผลิตหนอนกระทู้ผัก เพื่อนำไปใช้ผลิตเชื้อไวรัส SlNPV ทำให้ไม่สามารถทำการผลิตหนอนกระทู้ผักได้อย่างต่อเนื่อง การหาวิธีการควบคุมไม่ให้เกิดการระบาดของเชื้อโปรโตซัว จึงมีความสำคัญยิ่งต่อระบบการผลิตเชื้อไวรัส SlNPV ของหนอนกระทู้ผัก

จุดอ่อนของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดคือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และ Nucleo polyhedro virus อยู่ที่ความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมายและทำลายแมลงได้ช้า ดังนั้นการนำแนวความคิดที่จะนำ Bt และ NPV มาใช้ร่วมกันเพื่อควบคุมชนิดของแมลงศัตรูพืชได้กว้างขึ้น มีประสิทธิภาพทำลายแมลงศัตรูพืชเพิ่มขึ้น จะส่งผลทำให้ Bt และ NPV ได้เข้าไปมีบทบาทในระบบการจัดการแมลงศัตรูพืชเพิ่มมากขึ้น McEwen และ Hervey (1959) ได้เสนอแนะให้ใช้เชื้อ Bt ผสมกับไวรัส *Trichoplusia ni* NPV พ่นควบคุมหนอนคืบกระหล่ำปลี หลังจากนั้นได้มีผลการทดลองผสม Bt ผสมกับไวรัส NPV และ Granulosis virus (GV) พ่นควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ ในสภาพไร่ Stelzer (1965) ได้รายงานว่าการใช้ Bt ผสมกับไวรัส NPV พ่นควบคุมหนอน great basin tent caterpillar, *Marlacosoma fragile* (Stretch) ได้ผลดี ต่อมา Stelzer และคณะ(1975) ทำการทดลองโดยใช้ Bt ผสมกับ NPV ควบคุมหนอน douglas fir tussock moth, *Orgyia psendosugata* ได้ผลดีเช่นกัน Vail และคณะ(1972) ได้รายงานว่าสามารถใช้ Bt ผสม NPV พ่นควบคุมหนอนคืบกะหล่ำปลี *Trichoplusia ni* ได้ผลดี Jaques (1972), Jaques และ Laning (1978) ได้ใช้ BT ผสมกับ *Pieris rapae* GV ในการควบคุม *T. ni* และ *P. rapae* บนกะหล่ำปลี สามารถให้ผลควบคุมหนอนผีเสื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าการใช้เชื้อแต่ละชนิดเพียงอย่างเดียว Oatman และคณะ(1970) ได้ทดลองกับหนอนเจาะฝักข้าวโพด *Heliothis zea* พบว่า Bt ผสมกับ NPV ให้ผลในการควบคุมหนอนเจาะฝักข้าวโพดได้ดีกว่าการใช้ NPV ชนิดเดียว แต่ Chancey และคณะ (1973) ได้ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่าการผสม Bt กับ *T. ni* NPV ให้ผลไม่ดี และพบว่า Bt จะไปทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของ *T. ni* NPV เสียไป Mcvey และคณะ (1977) ได้ทำการทดลองผสม Bt และ NPV ในการควบคุมหนอนคืบกะหล่ำปลี ซึ่งการทดลองพบว่ามีผลในการเสริมฤทธิ์กัน และพบว่าดักแด้หนอนที่ได้รับเชื้อ Bt จะมีขนาดเล็กกว่าดักแด้ที่ได้จากหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อ Luttrell และคณะ (1982) ได้ผสม Bt กับ *Heliothis zea* NPV และ *Autographa californica* NPV ในการควบคุม *H. zea* และ *H. virescens* พบว่าไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมแมลงศัตรูพืชทั้ง 2 ชนิด ในการทดลองสภาพไร่ Bell and Romine (1980) ได้ทดลองพ่น Bt ร่วมกับ *A. californica* NPV และสาร adjuvant ในแปลงปลูกฝ้าย พบว่าวิธีการผสม Bt และ NPV ให้ผลผลิตฝ้ายสูงกว่าวิธีการอื่นๆ เพื่อให้การควบคุมความเสียหายของกุหลาบ การนำเชื้อไวรัส NPV มาใช้ร่วมกับเชื้อ Bt มาใช้ควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายและหนอนกระทู้ผักซึ่งระบาดพร้อมๆ กัน โดยใช้เชื้อ Bt จะควบคุมการระบาดได้ดี ขณะเดียวกันไวรัส HaNPV

และ SlNPV จะควบคุมหนอนที่มีขนาดตัวโต (วัย 3-5) ได้ จะทำให้สามารถควบคุมความเสียหายของกุหลาบได้ การนำเชื้อแบคทีเรีย Bt และไวรัส NPV มาใช้ร่วมกันเพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยการผสม Bt และ NPV เข้าด้วยกันเพื่อใช้พ่นในคราวเดียว จึงเป็นการนำ Bt และ NPV มาประยุกต์ใช้เพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูกุหลาบหรือนำไปใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูกุหลาบโดยวิธีผสมผสาน เพื่อแก้ปัญหาสารพิษตกค้าง และช่วยลดอันตรายจากสารฆ่าแมลงต่อเกษตรกร ต่อผู้บริโภค และช่วยลดต้นทุนการผลิตของเกษตรกร สามารถได้ผลผลิตที่มีคุณภาพตามที่ตลาดต้องการ

BT

การนำแบคทีเรีย บีที *Bacillus thuringiensis* มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายประเทศ นอกจากมีประสิทธิภาพในการกำจัดตัวอ่อนของผีเสื้อชนิดต่างๆ แล้วมีความปลอดภัยสูงต่อมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญแบคทีเรียชนิดนี้ไม่มีพิษตกค้างอยู่บนพืชเหมือนสารเคมีกำจัดแมลง (Dulmage, 1981; อัจฉรา, 2534) แบคทีเรียชนิดนี้เป็นแกรมบวก (gram positive) ที่ก่อโรคในแมลง อยู่ในกลุ่มแบคทีเรีย facultative anaerobe มีรูปร่างเซลล์เป็น ท่อน (rod shape) เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีหลายเส้นรอบเซลล์ (peritrichous flagella) และ สร้าง endospore อยู่ภายในเซลล์ สิ่งที่แตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรีย spore forming คือ ระหว่างการสร้างสปอร์จะเกิด parasporal protein crystal ใน sporangium โดยผลึกโปรตีนที่เรียกว่า delta-endotoxin ซึ่งเป็นพิษกับแมลง (Entwistle และคณะ, 1993) จากข้อตกลงขององค์การค้าโลกประเทศไทยต้องปฏิบัติตามมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช ดังนั้นการผลิตพืชให้ได้คุณภาพและมีความปลอดภัยตามมาตรฐานที่ถูกกำหนดขึ้น ส่งผลให้ไม่สามารถใช้สารเคมีกำจัดแมลงได้ตามที่เคยปฏิบัติในบางพืช โดยเฉพาะพืชส่งออกทั้งหลาย ดังนั้นการพัฒนาการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในประเทศมาใช้กำจัดโดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย บีที จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งของการแก้ปัญหานี้ เพื่อใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดแมลงในพืชชนิดต่างๆที่ประสบปัญหาการระบาดทำลายของแมลงศัตรูพืช (อัจฉราและคณะ, 2537) แต่ปัจจุบันพบว่ามีการแนะนำอย่างกว้างขวางให้เกษตรกรผลิตเชื้อไว้ใช้เองทั้งภาคเอกชนและภาครัฐรวมถึงจากเกษตรกรด้วยกันเอง แม้ว่าจะเป็นสิ่งที่เป็นประโยชน์และสอดคล้องกับวิถีเกษตรพอเพียง แต่ก็เป็นไปในลักษณะลองผิดลองถูก ขาดข้อมูลวิชาการที่เพียงพอในการสนับสนุนวิธีปฏิบัติดังกล่าว ทำให้เกษตรกรสูญเสียทั้งเวลาและทรัพย์สินโดยไม่จำเป็น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีต่างๆ รวมทั้งชนิดของสารอาหารที่ใช้เพาะขยาย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง มีประสิทธิภาพ ช่วยให้เกษตรกรสามารถนำไปปรับใช้ได้ด้วยตนเอง ซึ่งจะช่วยให้เกษตรกรสามารผลิตแบคทีเรีย บีที โดยวิธีง่ายๆ จากวัสดุอุปกรณ์ที่มีในท้องถิ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากเดิมการป้องกันกำจัดศัตรูพืชจะเน้นการใช้สารเคมีเป็นหลัก ซึ่งจากผลของการใช้สารโดยปราศจากความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้อง ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนผู้ผลิตและผู้บริโภค ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนามาเป็นการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน ตามนโยบายของกรมวิชาการเกษตรที่จะลดความเสี่ยงของประชาชน และลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยที่คุณภาพและผลผลิตไม่ลดลงและต้นทุนการผลิตไม่สูงขึ้น (กรมวิชาการเกษตร, 2542) ซึ่งจะใช้การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ และมีการใช้สารเคมีอย่างถูกวิธีร่วมด้วย เช่น มีการใช้เชื้อ Bt และไวรัส NPV ร่วมกับสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดให้สูงขึ้น แต่ทว่าเชื้อ Bt และไวรัส NPV มีฤทธิ์

เฉพาะเจาะจง สามารถควบคุมได้เฉพาะหนอนผีเสื้อที่กัดกินใบพืชเท่านั้น (อัจฉรา, 2544 ; อุทัย, 2544) ถึงแม้ว่าเชื้อ Bt จะมีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อมากกว่า 100 ชนิด (Porcar and Caballero, 2000) มีความเป็นพิษกับแมลงในอันดับ Diptera, Coleoptera, Homoptera และ Mallophaga (Beron *et al*., 2005) และไวรัส NPV จะมีประสิทธิภาพสูงต่อหนอนผีเสื้อที่อยู่ในสกุล Spodoptera ซึ่งเป็นแมลงในสกุลที่มีความสามารถในการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็วและดีที่สุดเมื่อเทียบกับแมลงในสกุลอื่น (El-Guidny *et al*.,1982 ; Smits, 1987) แต่ก็ไม่สามารถควบคุมไรศัตรูพืชและแมลงจำพวกปากดูด เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้งหรือเพลี้ยไฟได้ นอกจากนี้ยังมีโรคพืชที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆที่คอยรบกวนและทำลายพืชปลูกอีกด้วย ดังนั้นเกษตรกรจึงจำเป็นต้องใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเหล่านั้น ซึ่งในสภาพความเป็นจริงราคาของผลิตผลทางการเกษตรไม่ได้มีราคาสูงขึ้นสัมพันธ์กับสภาวะเศรษฐกิจในปัจจุบัน เมื่อเป็นเช่นนี้เกษตรกรจึงต้องใช้เชื้อ Bt และไวรัส NPV ผสมกับสารเคมีฉีดพ่นในคราวเดียวกัน เพื่อเป็นการลดต้นทุนค่าจ้างและประหยัดเวลาในการพ่นสาร และในปัจจุบันมีสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดใหม่ๆ ออกมาสู่ท้องตลาดมาก และยังไม่มีข้อมูลเบื้องต้นทางด้านการผสมกันได้ระหว่างจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดกับสารเหล่านั้น ว่าจะมีผลในการเสริมฤทธิ์หรือลดประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ใช้ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาเพื่อให้ทราบว่าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชเหล่านั้นจะมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อ Bt และไวรัส NPV อย่างไร และเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการตัดสินใจที่จะใช้สารเคมีเหล่านั้นร่วมกับการใช้จุลินทรีย์ในการทำการป้องกันกำจัดศัตรูพืช

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถสร้างสาร toxin ภายในเซลล์พร้อมๆ กับการสร้าง spore สาร toxin นี้มีคุณสมบัติทำลายแมลงศัตรูพืชหลายชนิดได้ดี โสธร (2512) รายงานว่าเชื้อ *Bt* ถูกนำเข้ามาในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 เพื่อควบคุมหนอนใยผัก *Plutella xylostella* และหนอนคืบกะหล่ำปลี *Trichoplusia ni* ซึ่งดื้อต่อสารฆ่าแมลง ต่อมาได้มีการนำเข้า *Bt* สายพันธุ์ใหม่ๆ เช่น aizawai ที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้กว้างขวางขึ้น (อัจฉรา, 2539) จากจุดอ่อนของความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมาย การคัดเลือกสายพันธุ์ *Bt* จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย นอกจากจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่เป็นข้อมูลของความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว อาจได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และสามารถทำลายแมลงได้มากชนิดขึ้นอีกด้วย เนื่องจากเชื้อ *Bt* แต่ละสายพันธุ์สร้างโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืชต่างชนิดกัน ซึ่งการสร้างนี้ถูกควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน Höfte และ Whiteley (1989) จึงได้จัดระบบอนุกรมวิธานของโปรตีนและยีนที่ควบคุมแต่ละชนิดว่า “cry ” และเรียกโปรตีนที่สร้างขึ้นว่า “Cry” การจำแนก cry gene และ cry protein ได้แยกกันตามความแตกต่างทั้งทางด้านประสิทธิภาพรูปร่าง และน้ำหนักโมเลกุล ในการจำแนกสายพันธุ์ของ *Bt* โดยการศึกษารูปร่างลักษณะของผลึกโปรตีนของสารพิษ (toxin) จากกล้องจุลทรรศน์ electron microscope

จากปัญหาของหนอนใยผักดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกษตรกรต้องใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น พิษตกค้างของสารฆ่าแมลงบนพืชผักจึงมีสูงขึ้น ผู้บริโภคประสบอันตรายจากสารพิษบนพืชผักเพิ่มมากขึ้น อัจฉราและคณะ (2527) ได้นำ *Bt* ที่ผลิตได้มาควบคุมหนอนใยผักบนกะหล่ำปลีอย่างได้ผล วินัย (2533) นำ *Bt* ไปใช้ในการบริหารแมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำ โดยนำไปใช้ลดและทดแทนสารฆ่าแมลง และได้มีการแนะนำให้ใช้ *Bt* ควบคุมแมลงศัตรูผักมากขึ้น อัจฉราและคณะ (2536) นำ *Bt* มาใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูส้มเขียวหวาน 3 ชนิด คือ หนอนแปะใบส้ม หนอนผีเสื้อกินใบส้ม และหนอนเจาะสมอฝ้าย อัจฉรา (2537) แยกเชื้อ *Bt* จากดินแหล่งปลูกพืชภาคตะวันออกเฉียงเหนือ isolate-TPR-2 นำมาผลิตทำสูตรผงโดยใช้วิธีทำด้วยเครื่อง freeze dry ละลายน้ำพ่นเปรียบเทียบกับ *Bt* ในท้องตลาด 2 ชนิด ในการควบคุมหนอนกระทู้หอมบนองุ่น พบว่า *Bt* ที่ผลิตได้ประสิทธิภาพต่ำกว่าของท้องตลาด กนกพร

(2539) รายงานถึงความต้านทานของหนอนกระทู้หอมต่อสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ และเชื้อ *Bt* พบว่าหนอนกระทู้หอมสร้างความต้านทานต่อ *Bt* น้อยกว่าสารฆ่าแมลง จึงแนะนำให้ใช้พ่นสลับกับสารฆ่าแมลงเพื่อชะลอปัญหาหนอนกระทู้หอมดื้อต่อสารเคมี จากปัญหาของพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงบนพืชผัก *Bt* จึงมีบทบาทสำคัญที่จะนำไปใช้เพื่อลดอันตรายดังกล่าว เนื่องจากสามารถควบคุมแมลงศัตรูผักได้หลายชนิดมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และไม่มีฤทธิ์ตกค้างบนพืชผัก ในปัจจุบันได้มีการนำเข้าเชื้อ Bt ประมาณ 60-100 ตันต่อปี จัดว่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสารฆ่าแมลงที่นำเข้าประมาณ 7,000 ตันต่อปี จะเห็นได้ว่าการนำ *Bt* ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นการช่วยลดปัญหาผลกระทบของสารฆ่าแมลง ปัญหาพิษตกค้างของสารฆ่าแมลง และเป็นการช่วยอนุรักษ์แมลงศัตรูธรรมชาติได้เป็นอย่างดี

เชื้อราแมลง

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรผู้ใช้รวมทั้งผู้บริโภคแล้ว ยังไม่ทำให้เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อม

เชื้อราขาว *Beauveria bassiana* เป็นจุลินทรีย์ ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จัดอยู่ใน Phylum: Ascomycota, Class: Sordariomycetes ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค “muscadine” ในแมลง โดยใน *B. bassiana* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “white muscadine” พบว่าเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคครั้งแรกกับหนอนไหม (Steinhaus, 1949) *B. bassiana* เป็นเชื้อราในดิน พบแพร่กระจายได้ทั่วไป แมลงอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Lepidoptera, Coleoptera และ Hemiptera แต่บางครั้งอาจจะพบในกลุ่ม Diptera และ Hymenoptera ด้วย (Tanada and Kaya, 1993) เชื้อราชนิดนี้ถูกนำมาผลิตใช้ในทางการค้าภายใต้ชื่อการค้าต่างๆ ในหลายประเทศ เช่น Bea-sin ใน เม็กซิโก, Boverin ใน รัสเซีย, Boverol-spofa ใน เช็กโกสโลวาเกีย, Conidia ใน โคลัมเบีย, Mycotrol ใน อเมริกา, Ostrinil ใน ฝรั่งเศส และ Proecol ในเวเนซุเอลา เป็นต้น (Wraight *et al*., 2001)

ในเมืองไทยมีการศึกษาการนำเชื้อราขาวมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชมากมาย จากรายงานผลงานค้นคว้าวิจัยตั้งแต่ปี 2525 -2539 โดยมลิวัลย์ ปันยารชุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา ได้ทำการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราดังกล่าวกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ พบว่าสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และหนอนเจาะขั้วผลเงาะ เป็นต้น เชื้อราขาว (*Beauveria bassiana*) ได้รับความสนใจจากเกษตรกรกลุ่มผู้ทำการเกษตรปลอดสารพิษเป็นจำนวนมาก เนื่องจากสามารถใช้ได้กับแมลงหลายประเภททั้งกลุ่มแมลงปากกัด ได้แก่ หนอนผีเสื้อศัตรูพืชชนิดต่างๆ และกลุ่มแมลงปากดูดได้แก่ เพลี้ยกระโดด, เพลี้ยไฟ, เพลี้ยแป้ง ฯลฯ ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้ทำความเสียหายให้กับพืชผลเกษตรเป็นจำนวนมาก การดำเนินงานในปีงบประมาณ 2554 – 2556 งานวิจัยเชื้อราโรคแมลงได้รับอนุเคราะห์เชื้อราบิวเวอเรียจากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรที่ได้มีการเก็บรวบรวมเชื้อราบิวเวอเรียจากมอดเจาะผลกาแฟในแปลงเกษตรกร และได้ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้ทั้ง 8 ไอโซเลท ในห้องปฏิบัติการ จนได้เชื้อราบิวเวอเรียที่มีประสิทธิภาพดีในการใช้ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟจำนวน 4 ไอโซเลท (ยุพินและคณะ, 2545) ต่อมา ประภาพรและคณะ (2556) ได้นำเชื้อราบิวเวอเรียทั้ง 4 ไอโซเลท มาขยายผลทดสอบประสิทธิภาพในสภาพไร่ และศึกษาถึงวิธีการเลี้ยงขยายปริมาณเชื้อราบิวเวอเรียดังกล่าว

ในปัจจุบันงานวิจัยเชื้อราโรคแมลงได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราบิวเวอเรียจากคุณประภาพร ฉันทานุมัติ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ซึ่งในปีงบประมาณ 2554 – 2556 ได้นำเชื้อราบิวเวอเรียดังกล่าวมาศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดอื่นนอกเหนือจากมอดเจาะผลกาแฟ โดยเปรียบเทียบกับเชื้อราบิว

เวอเรียสายพันธุ์กรมส่งเสริมการเกษตร และสายพันธุ์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ โดยแมลงที่ใช้ทำการทดสอบได้แก่ เพลี้ยแป้งสีชมพู เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม เป็นต้น เพื่อทราบประสิทธิภาพและนำข้อมูลที่ได้เพื่อการตัดสินใจในการนำไปใช้ หรือเผยแพร่ต่อเกษตรกรผู้สนใจต่อไป

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรผู้ใช้รวมทั้งผู้บริโภคแล้ว ยังไม่ทำให้เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อม เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) เป็นจุลินทรีย์ ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota ซึ่งเชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค “ muscadine” ในแมลง โดยใน *B. bassiana* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “white muscadine” พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera, Diptera และ Hymenoptera และ (Rosa และคณะ 2000; Tanada and Kaya, 1993) ในเมืองไทยมีการศึกษาการนำเชื้อราบิวเวอเรียมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชมากมาย จากรายงานผลงานค้นคว้าวิจัยตั้งแต่ปี 2525 -2539 โดยมลิวัลย์ ปันยารชุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา ได้ทำการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราดังกล่าวกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ พบว่าสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และหนอนเจาะขั้วผลเงาะ เป็นต้น ในปัจจุบันเชื้อรา *B. bassiana* ได้รับความสนใจจากเกษตรกรกลุ่มผู้ทำการเกษตรปลอดสารพิษเป็นจำนวนมาก เนื่องจากสามารถใช้ได้กับแมลงหลายประเภททั้งกลุ่มแมลงปากกัด ได้แก่ หนอนผีเสื้อศัตรูพืชชนิดต่างๆ และกลุ่มแมลงปากดูดได้แก่ เพลี้ยกระโดด, เพลี้ยไฟ, เพลี้ยแป้ง ฯลฯ ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้ทำความเสียหายให้กับพืชผลเกษตรเป็นจำนวนมาก

สืบเนื่องจากงานวิจัยในปีงบประมาณ 2554 ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลงได้รับความอนุเคราะห์เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* จากคุณประภาพร ฉันทานุมัติ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ซึ่งได้แยกเชื้อราชนิดนี้จากมอดเจาะเมล็ดกาแฟพันธุ์อาราบิก้า ต. เทพเสด็จ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ และได้ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพดีในการควบคุมมอดเจาะเมล็ดกาแฟ ดังนั้นในปีงบประมาณ 2555 - 2556 ทางห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีววิธี จึงได้นำเชื้อราดังกล่าวมาทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ เพลี้ยแป้งสีชมพู หนอนกระทู้ผัก, หนอนกระทู้หอม ด้วงหมัดผัก ตั๊กแตนผี และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยพบว่า เชื้อราชนิดนี้มีแนวโน้มที่ดีในการใช้ควบคุมตั๊กแตนผี เพลี้ยแป้งสีชมพู ด้วงหมัดผัก และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

จากข้อมูลเดิมของมลิวัลย์ และสุรพล (2525) ได้ทำการศึกษาและพัฒนาการผลิตเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* โดยการเลี้ยงเชื้อราเขียวในเมล็ดธัญพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด, ข้าวเปลือก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ซึ่งจากผลการทดลองได้สรุปว่า อาหารทั้ง 5 ชนิด สามารถผลิตราเขียวได้ปริมาณมากทุกชนิด แต่เนื่องจากข้าวโพด, ข้าวเปลือก และข้าวฟ่าง มีราคาประหยัดกว่าจึงมีความเหมาะสมที่จะใช้มากกว่าถั่วเขียว และถั่วเหลือง จากนั้นได้ทดลองเลี้ยงราเขียวเพื่อเปรียบเทียบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของอาหารและน้ำ โดยใช้เมล็ดธัญพืช ได้แก่ ข้าวโพด, ข้าวเปลือก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว และถั่วเหลือง ในปริมาณอย่างละ 40 กรัม จำนวน 5 ซ้ำ บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อน แล้วจึงเติมน้ำประปาในอัตรา 40, 50, 60 และ 70 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเขี่ยเชื้อราเขียวลงไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองได้สรุปว่าราเขียวเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอัตราส่วนของ อาหารต่อน้ำประปา 40: 40 การใส่อัตราส่วน 40: 60 และ 40: 70 จะทำให้อาหารที่ได้แฉะเกินไปซึ่งจะมีผลทำให้เชื้ออื่นๆ ขึ้นปะปนได้ง่าย จากข้อมูลการศึกษาการเลี้ยงเชื้อราเขียวที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าเชื้อราเขียวสามารถเจริญเติบโตได้บน

เมล็ดธัญพืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวโพด, ข้าวเปลือก, ข้าวฟ่าง, ถั่วเขียว และถั่วเหลือง แต่เนื่องจากข้อมูลเดิมยังไม่มีการชี้ชัดว่าเมล็ดธัญพืชชนิดใดทำให้เชื้อราเขียวสามารถสร้างโคนิเดียได้สูงสุด ต่อมาเสาวนิตย์ และคณะ (2548) ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยใช้ ข้าวเปลือก, ข้าวโพดบดหยาบ, ข้าวฟ่าง และปลายข้าว แทนการใช้ถั่วเขียว และถั่วเหลือง โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28 – 30 องศาเซลเซียส พบว่าข้าวโพดบดหยาบมีความเหมาะสมต่อราเขียวมากที่สุด เนื่องจากทำให้ราเขียวสร้างโคนิเดียได้มากที่สุด 8.13 X 10^{11} โคนิดีย/กรัม และเกิดการงอกของเชื้อได้ดีที่สุดที่ 6.04 X 10^{10}(cfu/กรัม) การศึกษาความชื้นในอาหารโดยใช้ข้าวโพดบดหยาบต่อปริมาณน้ำในอัตรา (1: 1) ทำให้อาหารมีความชื้น 54% ราเขียวสร้างโคนิเดียได้ดีที่ 8.50 X 10^{11} โคนิดีย/กรัม นอกจากนี้ได้ศึกษาการใช้โมลาสและยูเรียเพื่อกระตุ้นการสร้างโคนิเดียและพบว่าการเติมโมลาส 4% กระตุ้นให้สร้างโคนิเดียได้สูงสุดที่ 5.00 X 10^{11} โคนิดีย/กรัม ส่วนการใส่ยูเรียไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

ในปีงบประมาณ 2557 – 2558 ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลงจะได้ศึกษาถึงวิธีการเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรีย โดยใช้สายพันธุ์ของ ศวส.ชุมพร ที่ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้ว โดยอาศัยพื้นฐานของวิธีการเลี้ยงเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการคัดเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม การศึกษาความชื้นในอาหาร แหล่งคาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร ผลที่ได้จากการศึกษาจะนำมาเป็นองค์ความรู้ของหน่วยงาน และเป็นพื้นฐานในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อไป

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรผู้ใช้รวมทั้งผู้บริโภคแล้ว ยังไม่ทำให้เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อม

ราเขียวเมตาไรเซียม (*Metarhizium anisopliae*) (Metsch) Sorokin เป็นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ อยู่ใน Phylum: Ascomycota เชื้อราในกลุ่มนี้มักจะเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรค “muscadine” ในแมลง โดยใน *M. anisopliae* มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “green muscadine” พบแพร่กระจายได้ทั่วไป สามารถใช้ควบคุมแมลงในกลุ่ม Diptera, Lepidoptera, Orthoptera, Coleoptera, Hemiptera และ Hymenoptera (Lezama-Gutiérrez และคณะ 2000; Kershaw และคณะ 1999; Rosa และคณะ 2000)

ในเมืองไทยมีการศึกษาการนำเชื้อราเขียวมัสคาดีนในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมากมาย จากรายงานผลงานค้นคว้าวิจัยตั้งแต่ปี 2525 -2539 โดยมลิวัลย์ ปันยารชุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา ได้ทำการศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราดังกล่าวกับแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ พบว่าสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดได้แก่ ด้วงแรดมะพร้าว; *Oryctes rhinoceros*, มอดเจาะผลกาแฟ; *Hypothenemus hampei*, มวนโกโก้; *Helopeltis* spp. เป็นต้น การดำเนินงานที่ผ่านมาได้เก็บรวบรวมเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จากแหล่งต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท และได้นำมาทดสอบประสิทธิภาพเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีความเหมาะสม งานวิจัยของ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ ระหว่างเดือนตุลาคม 2550 - กันยายน 2553 ได้ทำการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพราเขียวเมตาไรเซียม *Metarhizium anisopliae* ในห้องปฏิบัติการ โดยเน้นการควบคุมแมลงศัตรูมะพร้าว ได้แก่ หนอนด้วงแรดมะพร้าว, หนอนแมลงดำหนาม และหนอนหัวดำมะพร้าว ซึ่งผลการทดสอบ ทำให้ได้ไอโซเลทเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมแมลงศัตรูมะพร้าวดังกล่าว (เสาวนิตย์ และคณะ, 2553) ในปี 2554 ได้มีการขยายผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวกับหนอนด้วงแรดมะพร้าว ในแหล่งปลูกมะพร้าว 2 พื้นที่คือ ต.สามเรือน อ. เมืองราชบุรี จ.ราชบุรี และ ต.โรงหีบ อ. บางคนที จ. สมุทรสงคราม โดยทำการทดสอบ 3 ครั้ง ผลการทดสอบ

พบว่าการใช้ราเขียวอัตรา 200 กรัม/ถังซีเมนต์ (ความจุ 0.25 ลูกบาศก์เมตร) มีความเหมาะสมในการใช้ นอกจากจะประหยัดเชื้อแล้ว ยังเป็นการลดการใช้เชื้อราเขียวเกินความจำเป็น และยังสามารถลดต้นทุนค่าใช้จ่ายและแรงงานในการผลิตเชื้ออีกด้วย (เสาวนิตย์ และคณะ, 2554)

การดำเนินงานในปี 2555 - 2556 จะได้นำราเขียวในห้องปฏิบัติการทั้ง 10 ไอโซเลทมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอื่นๆ โดยในปี 2555 ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพราเขียวทั้ง 10 ไอโซเลท กับด้วงหมัดผักในห้องปฏิบัติการ และในปี 2556 ได้คัดเลือกเชื้อราเขียวที่มีประสิทธิภาพดีมาขยายผลทดสอบต่อในสภาพไร่

ประเทศไทยส่งสินค้าทางการเกษตรจำพวกพืชผักเพื่อการส่งออกเป็นจำนวนมาก และมักจะประสบปัญหามีแมลงศัตรูพืชติดไปอยู่เสมอ แมลงศัตรูพืชที่มักพบเป็นปัญหาสำคัญต่อการส่งออกคือ แมลงหวี่ขาวยาสูบ; *Bemisia tabasi* Gennadius การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชส่วนใหญ่เกษตรกรมักนิยมใช้สารฆ่าแมลง ซึ่งเห็นผลเร็วแต่มักมีข้อเสียในด้านพิษตกค้างของสารเคมีซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้รวมทั้งผู้บริโภคด้วย

ปัจจุบันจึงมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้รับความสนใจคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรผู้ใช้รวมทั้งผู้บริโภคแล้ว ยังไม่ทำให้เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อม เชื้อราจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีขนาดเล็ก มีผู้คาดการณ์ว่ามีเชื้อราประมาณ 1.5 ล้าน ชนิด (species) ซึ่งในจำนวนนี้มีเพียง 70,000 ชนิด ที่สามารถแจกแจงชนิดได้ ในทางการเกษตรเชื้อราส่วนใหญ่ที่กล่าวถึงมักจะเป็นเชื้อราสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคกับพืช แต่ในทางกลับกันยังมีเชื้อราอีกกลุ่มหนึ่งที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคในแมลง ซึ่งถือเป็นเชื้อราที่มีประโยชน์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร เชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่างๆ เหล่านี้ ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo), *Hirsutella thompsonii* (Fisher), *Paecilomyces* sp., *Lecanicillium lecanii* (Zimmerman) Zare & Gams, *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, *Isaria* sp., *Aschersonia aleyrodis* Webber ฯลฯ เชื้อราเหล่านี้ถือเป็นเชื้อราที่มีประโยชน์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร เชื้อราบางชนิดมีการศึกษาและผลิตใช้ในเชิงการค้า ได้แก่ *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomeraea*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, เป็นต้น โดยประเทศที่มีการใช้เชื้อราต่าง ๆ เหล่านี้ ได้แก่ อเมริกา, เม็กซิโก, ออสเตรเลีย, โคลัมเบีย เป็นต้น (Wraight *et al*., 2001)

ห้องปฏิบัติการเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เก็บรักษาไว้ ได้แก่ *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Paecilomyces* sp., *Lecanicillium* sp. และ *Isaria* sp. ในจำนวนนี้มีเพียงเชื้อ *M. anisopliae* และ *B. bassiana* เท่านั้นที่เคยถูกนำมาใช้ในงานวิจัย ส่วนเชื้อรา *Paecilomyces* sp., *Lecanicillium* sp. และ *Isaria* sp. เป็นเชื้อที่แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่ จ.สุพรรณบุรี ในปี พ.ศ. 2554 และยังไม่เคยใช้ทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงศัตรูพืชชนิดใดมาก่อน ห้องปฏิบัติการเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจึงส่งเชื้อราดังกล่าวไปจำแนกสายพันธุ์ให้ชัดเจนที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมตามมติในที่ประชุมคณะกรรมการพิจารณาทะเบียนวิจัยปี 2557 ผลการจำแนกพบว่าได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง 2 สายพันธุ์คือ *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* ส่วน *Lecanicillium* sp. ที่ส่งไปผลการตรวจสอบพบว่าเป็นชนิดเดียวกับ *Paecilomyces lilacinus* ดังนั้นงานวิจัยในปีงบประมาณ 2557 – 2558 จะได้ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่างๆ ที่เก็บรักษาไว้ในห้องปฏิบัติการได้แก่ *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* ในการควบคุมแมลงหวี่ขาว (white fly) ซึ่งจะทำให้ทราบประสิทธิภาพของ

เชื้อราแต่ละชนิด และในอนาคตจะได้นำมาใช้ทดสอบกับแมลงศัตรูพืชที่สำคัญตัวอื่นๆ ผลที่ได้รับจะนำมาใช้เผยแพร่ต่อเกษตรกรผู้ปลูกผักอินทรีย์ต่อไป

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiotic bacterium โดยไส้เดือนฝอยตัวอ่อนวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) จะมีแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในลำไส้ส่วนหน้า และจะปลดปล่อยในระบบเลือดของแมลงเมื่อมันสามารถไชเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (Poinar and Thomas, 1966) ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุลนี้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวินทรีย์นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Poinar, 1979) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยแมลงอาศัย เช่น หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นหนอนที่เลี้ยงขยายเป็นปริมาณมากได้ง่าย จึงนิยมใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (วัชรี, 2540) ไส้เดือนฝอยสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมทั้งอาหารแข็ง (Bedding, 1981) และในอาหารเหลว (Friendman, 1990) การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ให้ได้ปริมาณมากเพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช จะต้องผลิตให้ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เป็นระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งเป็นระยะที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น สภาพที่ไม่มีอาหารหรือไม่มีแมลงอาศัย ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าสูตรอาหารเทียม และพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากแต่ต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางได้ทุกระดับ การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเทียมระยะแรก เลี้ยงบนอาหารเทียมที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปน เรียกว่า axenic culture ซึ่งส่วนประกอบของอาหารที่ใช้มีราคาแพง เช่น ตับของกระต่ายที่ตั้งท้อง แต่การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยไม่ดีนัก ต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารแข็ง เรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า monoxenic culture (Bedding, 1981)

ในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการทดลองนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ หลายชนิดได้เป็นผลสำเร็จ คือ หนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักในผักกาดหัว ด้วงงวงมันเทศ หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง นอกจากนี้ยังได้วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงขยายปริมาณมากด้วยอาหารเทียมทั้งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยปรับปรุงสูตรอาหารบางส่วนให้เหมาะสม และศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอยและการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปผสมในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย และต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยวัชรี และสุทธิชัย (2544) เป็นผลสำเร็จและเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนผลิตเป็นการค้าแล้ว

จากรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย S. riobrave ซึ่งพบในเขตภูมิอากาศใกล้แถบร้อนที่มลรัฐเท็กซัส (Cabanillas, 1994) ซึ่งภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย S. riobrave มี Xenorhabdus cabanillasii เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Poinar and Thomas, 1965) โดยไส้เดือนฝอยทำหน้าที่เป็นพาหะนำแบคทีเรียเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไชผ่านเข้าไปสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปล่อยแบคทีเรียออกมาสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารภายในตัวแมลงหมด ไส้เดือน*ฝอย S. riobrave* มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 35 ^{0}ซ จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มี

ประสิทธิภาพสามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิ 35 ^{0}ซ ได้ ในขณะที่ *S. carpocapsae* ไม่สามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิดังกล่าว และพบว่า *S. riobrave* สามารถเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมสูตรอาหารสุนัขผสมฟองน้ำได้ แต่ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง IJ ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมยังไม่คงที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัยและด้วยอาหารเทียมทั้งอาหารเหลวและอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตขยาย *Steinernema riobrave* ให้มีปริมาณมากสำหรับการนำไปใช้ป้องกันกำจัดแมลงในสภาพไร่ต่อไปในอนาคตต่อไป

ด้วงหมัดผักแถบลาย *Phyllotreta flexuosa* (Illiger) = *Phyllotreta sinuata* Stephens) ชอบทำลายผักในตระกูลกะหล่ำ เช่นกะหล่ำปลีกะหล่ำดอก กะหล่ำปม ผักคะน้า ผักกวางตุ้ง ผักกาดเขียวปลี และผักกาดหัว ระยะกล้าของผักที่มีอายุตั้งแต่ปลูกถึง 1 เดือนเป็นระยะที่สำคัญหากถูกทำลายจะ ทำให้ผักมีผลผลิตลดลงไม่สามารถส่งขายตลาดได้ หนอนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆ จะกัดกินรากของผักหรืออาจชอนไชเข้าไปกินอยู่บริเวณโคนต้นและแทะกินบริเวณผิวของรากทำให้พืชมีอาการเหี่ยวเฉาและตายในที่สุด ตัวเต็มวัยเข้าทำลายพืชผักทำให้เกิดความเสียหายมากโดยการกัดกินผิวด้านล่างของใบจนทำให้ใบมีลักษณะเป็นรูพรุนทั่วทั้งใบ รวมทั้งกัดกินผิวลำต้น และกลีบดอก แมลงพวกนี้มักมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ตัวเต็มวัยค่อนข้างว่องไวเวลาถูกกระทบกระเทือนชอบกระโดดและสามารถบินได้ไกล ๆ การป้องกันกำจัดทำได้ยาก แม้การใช้สารเคมี (จอมสุรางค์ และคณะ, 2550; วินัย, 2533) บางครั้งการระบาดเกิดขึ้นรวดเร็วและก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงจนไม่สามารถเก็บผลผลิตได้เกษตรกรจึงจำเป็นต้องใช้สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตลอดฤดูปลูกในอัตราสูงและบ่อยครั้ง ทำให้แมลงเกิดความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงที่ใช้ติดต่อกัน แนวทางในการลดปัญหานี้โดยการใช้การป้องกันกำจัดโดยชีววิธี เช่น การใช้จุลินทรีย์ ได้แก่ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae , S. riobrave* ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดโดยเฉพาะแมลงที่อาศัยในดินหรือที่มีมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม (Klein, 1990) และมีรายงานการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการควบคุมด้วงหมัดผักตัวเต็มวัยในสภาพห้องปฏิบัติการ (Trdana *et al*., 2008) ในประเทศไทยมีการใช้ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว โดยการพ่นหรือราดไส้เดือนฝอยอัตรา 320 ล้านตัว/น้ำ160 ลิตร ในพื้นที่ 1 ไร่ ลงดินในเวลาเย็นหลังการรดน้ำแปลงหลังหว่านเมล็ดและใช้ทุก 10 วัน จำนวน 3 ครั้ง สามารถควบคุมและลดการทำลายของด้วงหมัดผักได้ (วัชรีและคณะ, 2534) และมีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเขตภูมิอากาศแถบร้อนและจากการทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนเจาะฝักข้าวโพด ระยะก่อนเข้าดักแด้ และดักแด้ พบว่าทำให้แมลงตาย 89-100 % นอกจากนี้ยังพบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 35 ^{o}C (Cabanillas *et al*., 1994) ซึ่งยังไม่มีรายงานการใช้ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ควบคุมด้วงหมัดผัก ในประเทศไทย จึงทำการศึกษาประสิทธิภาพและอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในการควบคุมด้วงงวงมันผักระยะตัวเต็มวัยในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิจัยและพัฒนาให้เป็นแนวทางหนึ่งในการควบคุมด้วงหมัดผักเป็นการควบคุมโดยชีววิธีอีกทางหนึ่ง และเป็นข้อมูลในการควบคุมด้วงหมัดผักแถบลายด้วยการบริหารจัดการที่มีการประสานวิธีการควบคุมหลายรูปแบบอย่างเหมาะสมต่อไป

เนื่องด้วยประเทศไทยค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากพื้นที่ต่างๆ กัน โดยพบทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เป็นชนิดใหม่ๆ และที่เป็นชนิดเดียวกันกับที่ได้เคยมีการศึกษามาแล้ว ซึ่งไส้เดือนฝอย

ศัตรูแมลงทั้งหมดนี้ยังเก็บรักษาในรูปแบบที่สามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาสั้นเพียง 1-2 เดือน จำเป็นต้องนำออกมาต่อเชื้อขยายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงวิธีการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ให้ได้เป็นระยะเวลานาน 2-3 ปี โดยไม่จำเป็นต้องเสียเวลาในการต่อเชื้อ อีกทั้งยังไม่เป็นการลดประสิทธิภาพของต้นเชื้อเนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการต่อเชื้อหลายๆ ครั้ง

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย และรวมถึงเป็นแหล่งรวบรวมและสถานที่เก็บรักษาชนิดพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ยังคงมีชีวิตชนิดต่างๆ ไว้

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการดำเนินงานเพื่อได้เทคนิคการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย ด้วยวิธีการเก็บแบบ cryopreservation และเพื่อเป็นแหล่งหรือสถานที่เก็บรักษาชนิดพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย ประหยัดเวลาและแรงงานลดขั้นตอนในการต่อเชื้อเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาต่อยอดนำเทคนิคนี้ไปใช้กับไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ และถ่ายทอดเผยแพร่เทคนิคนี้ให้กับหน่วยงานที่รับผิดชอบงานทางด้านที่เกี่ยวข้องกันนี้

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methology)

กิจกรรมที่ 2 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช
กิจกรรมย่อยที่ 2.1 การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช
การทดลองที่ 2.1.1 พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง
วิธีดำเนินการทดลอง
อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น

2.วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระดาษกรอง ชุดกรองสารละลาย จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง ชุดเครื่องผ่าตัด หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose, Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซีส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต๊อคเซลล์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น

4. วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

วิธีการ

1. เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

เพาะเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง จาก Embryonic stem cell ตามเทคนิควิธีการของ สุชลวัจน์ (2545) เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27 °C ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 อัตราการเลี้ยงขยายเซลล์ (sub-culture) 1:5 ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มม. ทำการ sub-culture 3-4 วัน/ครั้ง คัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงให้มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) มากกว่า 80% เพื่อให้ได้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น 5-10 เท่า ภายใน 4-7 วัน ใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น (starter cells) จำนวน 2 ซ้ำ เพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมในแต่ละภาชนะ และอัตราการขยายเพิ่มปริมาณ บันทึกผลโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันต่อเนื่องด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ โดยคำนวณจากค่าร้อยละของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ แล้วคัดเลือก Se-cell line ไปใช้ในการทดลองที่ 2

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างหนอนและเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยโกร่งเย็น เติม PBS 1,000 µl เพื่อรักษาสภาพเซลล์ ปั่นเหวี่ยง 2,000 - 5,000 rpm 5 นาที เติม extraction buffer 500 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เติม cool 5M potassium acetate 120 µl และ proteinase K 10 µl แช่เย็น 30 นาที เติม phenol/chloroform 1:1 500 µl ปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 95% Cool ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของส่วนใส ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม

70% ethanol 200 µl ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนทิ้งให้ ethanol ระเหยที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer 30 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโตรโฟรีซีสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

2. เพาะเลี้ยงไวรัสจากเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

นำเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ข้างต้น มาเลี้ยงขยายในภาชนะแบบ T-flask ใช้เซลล์ตั้งต้น 2 x 10^5 – 1 x 10^6 เซลล์/มล. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัสในเซลล์หนอน กระทู้หอมเพาะเลี้ยง หลังจาก sub-culture 4 วัน และเพาะอนุภาคไวรัส (infection) จากเลือดหนอนกระทู้หอม ในเซลล์เพาะเลี้ยง อนุภาคไวรัสที่ใช้มีค่า Multiplicity of infection (MOI) ที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น 2 x 10^5 - 1 x 10^6 เซลล์/มล. จำนวน 2 ซ้ำต่ออัตราอนุภาคไวรัส หลังจากนั้นตรวจดูการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ ตรวจนับจำนวนผลึกไวรัสที่ได้ด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ คัดเลือกอัตราอนุภาคไวรัสที่ดีที่สุดในการทดลองข้างต้นนำมาใช้ผลิตขยายแบบต่อเนื่องจำนวน 3 รอบการผลิต โดยทำการปั่นแยกอนุภาคไวรัสจากผลผลิตไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง ปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000*g* นาน 8 นาที มาใช้เพาะเลี้ยงอนุภาคไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงในรอบการผลิตถัดไป รอบที่ 1 และ 2 ในภาชนะ แบบ cell spin flask (ปริมาตร 500 – 1,000 มล./ขวด)

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เปรียบเทียบกับไวรัสที่ผลิตจากหนอนแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงตามวิธีการของ (Wongwilikhit *et al.* 2008) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโตรโฟรีซีสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย ตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 2.1.2 พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น

2.วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระดาษกรอง ชุดกรองสารละลาย จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose, Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซีส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต๊อคเซลล์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น

4. วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

วิธีการ

1. เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง และเซลล์เพาะเลี้ยง

2 พัฒนาวิธีการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะสั้น โดยการเก็บรักษาในภาชนะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25-28 $^{\circ}$C เช่น 5, 10, 15, 20, 25 $^{\circ}$C เก็บข้อมูลทุก 3, 5, 7, 10, 15 วัน

3. พัฒนาวิธีการการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะยาว โดยการเก็บรักษาในภาชนะทนอุณหภูมิต่ำมาก เช่น -20, - 80 และ -196 $^{\circ}$C เก็บข้อมูลทุก 6 เดือน

4. ตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษา ด้วยค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ (cells viability) และ เทคนิคชีวโมเลกุล ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างหนอนและเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยโกร่งเย็น เติม PBS 1,000 µl เพื่อรักษาสภาพเซลล์ ปั่นเหวี่ยง 2,000 - 5,000 rpm 5 นาที เติม extraction buffer 500 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เติม cool 5M potassium acetate 120 µl และ proteinase K 10 µl แช่เย็น 30 นาที เติม phenol/chloroform 1:1 500 µl ปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 95% Cool ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของส่วนใส ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol 200 µl ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนทิ้งให้ ethanol ระเหยที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer 30 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอีเล็กโตรโฟรีซีสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

5. บันทึกผลทุกขั้นตอน พร้อมสรุปผล

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย ตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 2.1.3 การพัฒนารูปแบบชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม The Bioproduct Development of Nucleopolyhedrovirus

อุปกรณ์

1. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. คอมพิวเตอร์และโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ
5. วัตถุดิบและสารเคมีอื่นๆ ได้แก่ เชื้อไวรัส ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV), อาหารเทียมเลี้ยงหนอน, หางนม, สารผสมหรือสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆได้แก่ Anti microbial, Kaolin และสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ เป็นต้น

6. อุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า, เครื่องบด, กล่องเลี้ยงแมลง, ถ้วยพลาสติกเลี้ยงหนอน, หลอดทดลอง (vial), ขวดพลาสติกขาว, ถาดพลาสติก และถาดโลหะ เป็นต้น

วิธีการ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้หอม ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ

นำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมมาปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1x10^9$ ผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (vial) หลอดละ 15 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ตู้ละ 3 หลอด นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำหลอดออก 1 หลอดทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ผ่านการทดลองแล้วทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อด้วยวิธี Feeding method กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 โดยการเคลือบเชื้อไวรัสบนผิวหน้าของอาหารเทียมถ้วยละ 15 ไมโครลิตร ให้หนอนกินถ้วยละ 1 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 20 ตัว รวม 80 ตัวต่อกรรมวิธี เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่ไม่ได้บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม (control) บันทึกจำนวนหนอนที่ตายทุกวันจนหนอนตายหรือเข้าดักแด้หมด ถ้ามีหนอนตายใน control ให้ทำการปรับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนโดยวิธี Abbott (1925) แล้วนำเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ปรับค่ามาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขั้นตอนที่ 2 การพัฒนาสูตรผงสำเร็จรูปด้วยสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ

วางแผนการทดลองด้วยวิธี Mixture design โดยกำหนดปัจจัยที่ทำการศึกษาแบบกำหนดช่วง (Constrained simplex lattice mixture design) ตามวิธีของ Montgomery (2005) ส่วนผสมหรือปัจจัยที่ศึกษาประกอบด้วย 3 ปัจจัย ได้แก่ skim milk, kaolin และ surfactant A มีช่วงการศึกษาปัจจัยประกอบด้วย skim milk (X_1) ร้อยละ 30-40 , kaolin (X_2) ร้อยละ15-30 และ surfactant A (X_3) ร้อยละ 30-50 โดย $X_1+ X_2+ X_3 = 1$ จำนวนสูตรที่ทำการศึกษาคำนวณได้จากสูตร $n = 2^q - 1$ เมื่อ n คือ จำนวนสูตร และ q คือ จำนวนส่วนผสมของสูตร ดังนั้น จำนวนจุด คำนวณจากสูตรได้เท่ากับ $2^3 - 1 = 7$ จุด และเพิ่มจุดที่ศึกษาในจุดกึ่งกลางด้านข้าง 2 จุด ได้ทั้งหมด 9 สูตร และให้ส่วนผสมอื่นมีปริมาณคงที่ในทุกสูตร

ขั้นตอนที่ 3 การผลิตสูตรสำเร็จรูปชนิดผง

เมื่อได้อัตราส่วนที่เหมาะสมในข้อ 2 แล้ว นำส่วนผสมทั้งหมดผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน ปั่นช้าๆ ด้วย Blender จนเข้ากันด้วยดี นำไปใส่ถาดแผ่กระจายให้เป็นแผ่นบางๆ แล้วไปอบในตู้อบลมร้อน (Hot air oven) อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียล นาน 6 ชม. จึงนำออกมาทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง บดละเอียด ก่อนบรรจุในขวดแก้วสีชา เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี Feeding method กับหนอนกระทู้หอมวัย 3 เช่นเดียวกับในขั้นตอนที่ 1 วิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS 10

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนที่ตายจากการทดสอบในขั้นตอนต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.1.4 การเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ชนิดต่างๆด้วยเทคนิค Microencapsulation

อุปกรณ์

1. เครื่องบดละเอียดความเร็วสูง DMF 2B ความเร็วรอบ 28,000 รอบต่อนาที
2. สารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ ได้แก่ Titanium dioxide, congo red, กากน้ำตาล(molasses), ถ่านไม้ผง (carbon charcoal) และ หางนมผง (Skim milk)
3. แป้งชนิดต่างได้แก่ แป้งบริสุทธิ์จากธัญพืช, น้ำมันพืชบริสุทธิ์ (refined vegetable oil), และแป้งมันสำปะหลังดัดแปร(modified tapioca starch)
4. เครื่องวัดพลังงานแสง และเครื่องวัดแสงยูวี ชนิด บี (LT Lutron UV-340)
5. กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) และแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)
6. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ หลอดยูวี ชนิดบี Phillip 26 W, อาหารเทียมเลี้ยงแมลง, ภาชนะเลี้ยงแมลง และถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์

วิธีการ

1. ทดสอบการเคลือบอนุภาคไวรัสด้วยวิธี Starch-encapsulation โดยดัดแปลงจากวิธีของ Dunkle และ Shasha (1988) ด้วยการนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม. มาผสมกับน้ำบริสุทธิ์ และน้ำมันพืชบริสุทธิ์ (refined vegetable oil) ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปผสมกับสารป้องกันรังสียูวีแต่ละชนิดที่ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้วได้แก่ Titanium dioxide, Congo red, Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk กับ modified tapioca starch ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้แป้งคืนตัว (retrogradation) แล้วจึงนำส่วนผสมทุกสูตรทั้งหมดออกมาวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปผสมกับแป้งบริสุทธิ์ที่ผลิตจากธัญพืช โดยปรับอัตราส่วนผสมทั้งหมดให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1x10^9$ PIB/ml นำไปบดให้ละเอียดอย่างช้าๆ แล้วเก็บตัวอย่างในตู้เย็นระหว่างการนำไปถ่ายภาพเพื่อดูโครงสร้างของไวรัสใต้กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน

2. การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการ

2.1 เตรียมอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนในภาชนะมีฝาปิดขนาดปริมาตร 2 ออนซ์ แล้วเคลือบผิวหน้าอาหารเทียมด้วยชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส หนอนกระทู้หอมที่เตรียมเสร็จแล้วในข้อ 1 ถ้วยละ 30 ไมโครลิตร กรรมวิธีละ 30 ถ้วย จำนวน 2 ชุด โดยใช้อัตราความเข้มข้นเช่นเดียวกับอัตราที่แนะนำ ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นเคลือบผิวหน้าอาหารเทียม

2.2. นำถ้วยอาหารเทียมชุดแรกทั้งหมดที่เตรียมเสร็จแล้วไปเข้าตู้ทึบที่ติดหลอดยูวี ชนิดบี ที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 250-300 นาโนเมตร แหล่งกำเนิดแสงใช้หลอดยูวีชนิดบี ที่มีกำลังส่องสว่าง (output) 26 วัตต์ต่อ 100 ชั่วโมง จำนวน 2 หลอด ติดตั้งหลอดให้มีระยะครอบคลุมตัวอย่างเท่ากันทั่วพื้นที่สำหรับวางตัวอย่าง และวัดระดับแสงด้วยเครื่องวัดแสงยูวี LT Lutron UV-340 ให้ได้พลังงานแสงตกลงพื้นที่เท่ากับ 1 $\mu W/cm^2$ ระยะห่างของตัวอย่างถึงแหล่งกำเนิดแสงประมาณ 20 เซนติเมตร ให้ถ้วยอาหารเทียมทั้งหมดผ่านรังสียูวีเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชม. ตามลำดับ ส่วนอาหารชุดที่ 2 ไม่ต้องผ่านแสงยูวี แล้วนำอาหารทั้ง 2 ชุด เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 6 ± 2 $^{\circ}C$ เพื่อรอทดสอบ Bioassay กับหนอนกระทู้หอม ด้วยวิธี feeding method ต่อไป

2.3. นำถ้วยอาหารเทียมที่ผ่านรังสียูวีและไม่ผ่านรังสียูวี ตามเวลาที่กำหนดไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอม วัย 3 ถ้วยละ 1 ตัว กรรมวิธีละ 30 ถ้วย ตรวจนับการตายของหนอนที่ 3, 5 , 7และ 10 วัน ตามลำดับ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนการตายของหนอนจากการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553-กันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.1.5 ศึกษาชีววิทยาของโปรโตซัวที่เข้าทำลายระบบการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัส Nucleopolyhedrovirus และการควบคุม

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ สารเคมี

1. อุปกรณ์แยกเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ ได้แก่ sieve ขนาด 150 micrometer เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่อง ultra centrifuge น้ำตาล sucrose

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลง ได้แก่ ขวดดอง ถุงพลาสติก ปากคีบ ตะกร้า กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 19x28x11 เซนติเมตร

3. อุปกรณ์ทำสไลด์ ได้แก่ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ น้ำกลั่น haemacytometer

4. อุปกรณ์จำแนกสัณฐานวิทยาของเชื้อโปรโตซัว ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดบันทึกภาพ กล้องบันทึกภาพ

5. อุปกรณ์เพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก ได้แก่ กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 22x15x5 เซนติเมตร โถแก้ว ขันผ้าขาวบาง ยางรัด ปากคีบ น้ำผึ้ง น้ำกลั่น พู่กัน

6. อุปกรณ์ทำอาหารเทียม ได้แก่ เครื่องปั่นผสมอาหาร วุ้น ถั่วเขียว วิตามิน สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการ

1. ศึกษาวิธีการแยกเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์

คัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่แสดงอาการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในห้องปฏิบัติการ นำหนอนที่ได้มาบดในน้ำกลั่น นำสารแขวนลอยที่ได้มากรองด้วย sieve ขนาด 150 micrometer เพื่อแยกเอาเนื้อเยื่อหนอนออก นำของเหลวส่วนบนที่ได้มาแบ่งเป็นส่วนๆ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบต่างๆ ดังนี้

1 อัตราความเร็ว 1,000 RPM 3 นาที และ 2,000 RPM 10 นาที
2 อัตราความเร็ว 1,000 RPM 3 นาที และ 2,000 RPM 20 นาที
3 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 2,000 RPM 10 นาที
4 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 2,000 RPM 20 นาที
5 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 3,000 RPM 10 นาที
6 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 3,000 RPM 20 นาที

7 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 5,000 RPM 10 นาที

8 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 5,000 RPM 20 นาที

จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเครื่อง ultra centrifuge โดยวิธี sucrose gradient centrifugation ที่ 24,000 RPM 30 นาที นำเชื้อโปรโตซัวที่ปั่นแยกได้มาตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อโปรโตซัวในแต่กรรมวิธี ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด haemacytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกข้อมูลปริมาณสปอร์เชื้อโปรโตซัวที่นับได้ ลักษณะของตะกอนเชื้อโปรโตซัวที่ได้ คำนวณหาค่าเฉลี่ยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2. ศึกษาปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{2}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 2 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{4}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 3 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{6}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 4 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{8}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 5 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{10}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่น

คัดเลือกหนอนกระทู้ผักวัย 1 ที่ปราศจากเชื้อโปรโตซัวจำนวน 1 ตัวต่อถ้วย ซ้ำละ 5 ถ้วย ให้หนอนอดอาหาร 24 ชั่วโมง เตรียมอาหารเทียมตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด เทอาหารเทียมในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ นำไปเลี้ยงหนอนที่เตรียมไว้ โดยใช้เชื้อโปรโตซัวที่ปั่นแยกได้หยดลงบนผิวหน้าอาหารเทียม (diet plug method) 30 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 ถ้วย ย้ายหนอนไปเลี้ยงในอาหารเทียมแต่ละกรรมวิธี จากนั้นชั่งน้ำหนักหนอนทุก 24 ชั่วโมง บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก เปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้ และตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากสารคัดหลั่งของหนอนแต่ละตัว และปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกันในหนอนกระทู้ผักวัย 2, 3, 4 และ 5

เมื่อดักแด้ของหนอนกระทู้ผักวัย 2 - 5 กลายเป็นตัวเต็มวัย จับคู่ผีเสื้อในโหลแก้ว ให้น้ำหวานและความชื้น เพาะเลี้ยงผีเสื้อให้วางไข่ จากนั้นเก็บไข่ผีเสื้อแต่ละวัยมาเพาะเลี้ยง บันทึกน้ำหนัก ระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนแต่ละวัย นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากสารคัดหลั่งของหนอนแต่ละตัว

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.1.6 การใช้สูตรผสมไวรัส NPVและแบคทีเรีย Bt ในการควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูกุหลาบ

วิธีการทดลอง

- อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*
2. ไวรัส *Helicoverpa armigera* NPV (HaNPV)
3. ไวรัส *Spodoptera litura* NPV (SlNPV)
4. หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผัก
5. อาหารเทียมเลี้ยงแมลง

6. ถ้วยพลาสติกขนาด 1 ออนซ์ ปากคีบ พู่กัน
7. เครื่องหยดสารละลาย
8. เครื่องยนต์พ่นสารแบบสะพายหลัง
9. แปลงปลูกกุหลาบขนาด 1 ไร่

- วิธีการ

<u>การทดลองที่ 1</u> ทำการทดลองใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับไวรัส *Helicoverpa armigera* NPV (HaNPV) และไวรัส *Spodoptera litura* NPV (SlNPV) โดย วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ ใช้แมลงทดสอบซ้ำละ 10 ตัว แยกการทดลองตามชนิดของแมลงดังนี้

1.1 หนอนเจาะสมอฝ้าย มี 15 กรรมวิธีดังนี้

1. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
2. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
3. ไวรัส HaNPVอัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
4. ไวรัส HaNPVอัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
5. ไวรัส HaNPVอัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
6. ไวรัส HaNPVอัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
7. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
8. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
9. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
10. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
11. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
12. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
13. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
14. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ HaNPV อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
15. control

1.2 หนอนกระทู้ผัก มี 15 กรรมวิธีดังนี้

1. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
2. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
3. ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
4. ไวรัส SlNPV อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
5. ไวรัส SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
6. ไวรัส SlNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
7. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
8. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
9. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
10. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
11. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
12. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
13. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

14. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

15. control

ทำการทดลองโดยวิธี surfaced layer method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกขนาด 1 ออนซ์ โดยหยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหาร ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเทียมแห้ง ใช้พู่กันเขี่ยหนอนทดลองใส่ถ้วยละ 1 ตัว ตรวจนับการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน

<u>การทดลองที่ 2</u> ทดลองใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับไวรัส SlNPV ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในแปลงกุหลาบ วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

1. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
2. ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
3. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
4. เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
5. ไม่พ่นสารฆ่าแมลง

ทำการทดลองในแปลงกุหลาบ ขนาดแปลงย่อย 4.5x5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงย่อย 1.50 เมตร โดยปลูกกุหลาบเป็นแถว มีระยะปลูก 0.90x1.50 เมตร การทดลองพ่นสารจะใช้เครื่องยนต์พ่นสารแบบสะพายหลังชนิดแรงดันน้ำสูง ขนาดรูหัวฉีด 1.5 มิลลิเมตร อัตราการไหลของหัวฉีด 2.4 ลิตรต่อนาที อัตราการใช้น้ำ 80 ลิตรต่อไร่ ทำการพ่นสารทดลองทุก 7 วัน โดยพ่นสารในช่วงเวลา 15.00-17.00 น. การตรวจนับแมลงจะทำตอนเช้าของวันที่พ่นสาร โดยสุ่มนับจำนวนไข่ หนอนขนาดเล็ก กลาง และใหญ่ จำนวนดอกที่ถูกทำลาย โดยสุ่มนับแปลงย่อยละ10 ต้น บันทึกข้อมูลจำนวนไข่ จำนวนหนอน ขนาดของหนอน จำนวนดอกที่ถูกเจาะทำลาย และจำนวนดอกในแต่ละแปลงย่อยที่มีคุณภาพจำหน่ายได้ (marketable yield)

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา **:** ตุลาคม 2553 - กันยายน 2555

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และในแปลงปลูกกุหลาบของเกษตรกร อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

กิจกรรมย่อยที่ 2.2 การผลิตและการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. ปั๊มลมเป่าอากาศขนาด 16 W (ความดัน 0.02Mpa, Output 25 L/min)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมีต่างๆ ได้แก่ TSA, NA และ Nacl 0.85% w/v
3. วัตถุดิบที่ใช้ในการเพาะขยายเชื้อ ได้แก่ หางนม, นมข้นหวาน, น้ำมะพร้าว, ชานอ้อยอบแห้ง. รำ, ข้าวฟ่าง, ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ และข้าวสุก
4. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ ได้แก่ ถ้วยแก้ว กระบอกตวง Flask และ Plate เป็นต้น
5. เชื้อแบคทีเรีย บีที (*Bacillus thuringiensis*) มาตรฐาน ได้แก่ *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 53,000 SU/mg (เดลฟิน^{R}), และ เชื้อทั่วไป ได้แก่ หัวเชื้อจุลินทรีย์ชนิดหมักขยาย (พลายแก้ว^{R})
6. หนอนกระทู้หอมวัย 2

วิธีการ การศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเชื้อแบคทีเรีย Bt สูตรต่างๆ

1. ทำการผลิตเชื้อแบคีเรีย Bt ด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

การเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย บีที โดยใช้ชีวภัณฑ์ที่จำหน่ายในท้องตลาด คือ เชื้อ *Bacillus thuringiensis* (เดลฟิน™) ผสมลงในสารอาหารชนิดต่างๆด้วยวิธีที่เกษตรกรปฏิบัติ ซึ่งแบ่งตามชนิดของอาหารที่ใช้เพาะขยายเชื้อเป็น 2 ประเภท คือ

1.1 ชนิดอาหารเหลว (submerged culture) ได้แก่ น้ำมะพร้าวอ่อน 1 ผลผสมไข่ไก่ 1 ฟอง และเชื้อ พลายแก้ว 45 กรัม และใช้ หางนม, นมข้นหวาน และน้ำมะพร้าว ผสมน้ำกลั่นสะอาด อัตราส่วนผสมโดยผสมอาหารต่อเชื้อแบคที่เรีย บีที (เดลฟิน®) ในอัตราส่วนน้ำ 10 ส่วนต่อเชื้อแบคทีเรีย บีที 1 ส่วน ใส่ในขวดพลาสติก ขนาด 2 ลิตร เป่าอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 48 ชม.

1.2 ชนิดอาหารแข็ง (solid state fermentation) ได้แก่ ชานอ้อยผสมรำข้าว ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวฟ่าง และข้าวสุก แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วจึง ผสมน้ำกลั่นสะอาดเพื่อเพิ่มความชื้นในอาหารอัตราส่วน 1:1 แล้วนำไปผสมกับเชื้อแบคที่เรีย บีที ในอัตราส่วนน้ำ 5 ส่วนต่อเชื้อแบคทีเรีย บีที 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้าใส่ในถาดแล้วหุ้มด้วยถุงพลาสติกใส มัดปากไม่ต้องแน่น เพื่อให้อากาศผ่านได้ หมักเป็นเวลา 48 ชม. แล้วจึงนำไปแยกเอาเชื้อที่หมักได้ออกมา โดยผสมน้ำสะอาดในอัตราส่วน 1 : 1

2. นำเชื้อที่สกัดได้ไปตรวจนับจำนวนเซลล์ (Total cell count) โดยนำตัวอย่างเชื้อมาเจือจางแบบ serialiy dilution กับ sterile saline solution (0.85% w/v Nacl) ดูดสารละลายที่เจือจางนี้มา 0.1 ml แล้ว spread plate บนอาหาร TSA บ่มเชื้อที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ แล้วจึงตรวจนับ colony หลังจากนั้นจึงตรวจนับจำนวนสปอร์ (Spore count) โดยนำ dilution ของเชื้อ Bt ที่ได้จากการนับโคโลนี มาให้ความร้อนบน water bath ที่อุณหภูมิ 80 °C นาน 10 นาที แล้วนำขึ้นแช่ในน้ำแข็งทันทีนาน 5 นาที และจึงทำ spread plate บนอาหาร TSA บ่มเชื้อที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้เชื้อเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกัน แล้วจึงตรวจนับ colony

3. ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเข้ามาในระหว่างขบวนการผลิต

4. ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ผลิตได้กับหนอนผีเสื้อศัตรูพืชที่สำคัญ ได้แก่หนอนกระทู้ผัก ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Bioassay บนอาหารเทียม

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกอัตราการเจริญของเชื้อ Bt ในแต่ละวิธีการผลิต
- ตรวจสอบและวิเคราะห์ปริมาณของ crystal toxin ที่เชื้อ Bt สร้างขึ้น
- บันทึกปริมาณและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในระหว่างขบวนการผลิต
- บันทึกประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่ทำการทดสอบกับหนอนทดลองชนิดต่างๆ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.2.2 การศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และ ไวรัส NPV

- อุปกรณ์ - 1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*
3. ไวรัส Nucleopolyhedro virus
3. กล้องจุลทรรศน์
4. จานแก้วเพาะเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ
6. อาหารเทียมเลี้ยงแมลง
7. สารป้องกันกำจัดโรคพืช ได้แก่ carbendazim, chlorothalonil, difenoconazole และ captan
8. สารป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชได้แก่ amitraz และ pyridaben
9. สารป้องกันกำจัดแมลงได้แก่ imidacloprid, fipronil และ thiamethoxam

- วิธีการ - <u>ขั้นตอนที่ 1</u> ศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Bt และไวรัส NPV

โดยนำสารชนิดต่างๆมาผสมกับเชื้อ Bta เชื้อ Btk และไวรัส NPV ในอัตราต่างๆดังนี้
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ carbendazim อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorothalonil อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ difenoconazole อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ captan อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ amitraz อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ pyridaben อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ imidacloprid อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiamethoxam อัตรา 2 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

จากนั้นทำการตรวจนับปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย Bt หลังจากผสมสารดังกล่าวแล้วที่เวลา 0, 1, 3 และ 5 ชั่วโมง บันทึกปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย Bt ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> ก. ศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย Bt โดยทำการทดลองประสิทธิภาพของเชื้อ Bta และเชื้อ Btk ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ แล้วกับหนอนกระทู้หอม ซึ่งการทดสอบเชื้อ Bt แต่ละชนิดจะวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 11 กรรรมวิธี ดังนี้

1. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
2. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ carbendazim อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

3. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorothalonil อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
4. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ difenoconazole อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
5. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ captan อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
6. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ amitraz 20% EC อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
7. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ pyridaben อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
8. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ imidacloprid 10% SL อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
9. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil 5% SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
10. Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiamethoxam 25% WG อัตรา 2 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
11. control

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ Bt หลังจากผสมสารตามกรรมวิธีดังกล่าว และตั้งทิ้งไว้ที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยทำการทดลองด้วยวิธี surfaced layer method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ หยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหาร ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเทียมแห้ง ใช้พู่กันเขี่ยหนอนทดลองใส่ถ้วยละ 1 ตัว ตรวจนับการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำเชื้อ Bt ที่ผสมสารแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1, 3 และ 5 ชั่วโมง นำมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธีการนี้เช่นเดียวกัน

ข. ศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของไวรัส NPV

โดยทำการทดลองประสิทธิภาพของไวรัส SeNPV และHaNPV ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ แล้วกับหนอนกระทู้หอมและหนอนเจาะสมอฝ้าย ซึ่งการทดสอบไวรัส SeNPVจะวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 11 กรรรมวิธี ดังนี้

1. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
2. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ carbendazim อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
3. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorothalonil อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
4. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ difenoconazole อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
5. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ captan อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

6. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ amitraz อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
7. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ pyridaben อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
8. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ imidacloprid อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
9. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
10. SeNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiamethoxam อัตรา 2 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
11. control

และการทดสอบไวรัส HaNPV จะวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ 11 กรรรมวิธี ดังนี้

1. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
2. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ carbendazim อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
3. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ chlorothalonil อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
4. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ difenoconazole อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
5. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ captan อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
6. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ amitraz อัตรา 60 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
7. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ pyridaben อัตรา 15 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
8. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ imidacloprid อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
9. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ fipronil อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร
10. HaNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ thiamethoxam อัตรา 2 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
11. control

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไวรัส NPV หลังจากผสมสารตามกรรมวิธีดังกล่าว โดยทำการทดลองด้วยวิธี surfaced layer method บนผิวหน้าอาหารเทียมที่บรรจุในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ หยดสารแต่ละกรรมวิธีด้วยเครื่องหยดสารละลาย อัตรา 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมหมุนวนบนผิวหน้าของอาหารเทียม เพื่อให้สารทดลองเคลือบทั่วผิวหน้าอาหาร ปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที เพื่อให้ผิวหน้าของอาหารเทียมแห้ง ใช้พู่กันเขี่ยหนอนทดลองใส่ถ้วยละ 1 ตัว ตรวจนับการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 7 วัน

- เวลาและสถานที่

- ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ชื่อการทดลอง 2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ไอโซเลทต่างๆ ในการควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืช

อุปกรณ์

1. เชื้อ *Bt* ไอโซเลท DOA45026046, DOA45030011, DOA45096002, DOA45558017 และ DOA45647002
2. วัสดุ อุปกรณ์เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ *Bt* ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ เครื่องเขย่าเชื้อ แอลกอฮอล์
3. ตู้เขี่ยเชื้อ
4. กล้องจุลทรรศน์
5. เครื่องแยกเชื้อบริสุทธิ์ (centrifuge)
6. อุปกรณ์ทำแปลงทดลอง ได้แก่ เมล็ดพันธุ์ สารเคมีกำจัดวัชพืช สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ถังพ่นยา

วิธีการ

1. เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ *Bt* ไอโซเลท DOA45026046, DOA45030011, DOA45096002, DOA45558017 และ DOA45647002 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้ใส่ในฟลาสก์ที่บรรจุ Nutrient Broth นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. นำเชื้อที่ได้มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบการสร้างผลึกและการปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ หากไม่พบการปนเปื้อนนำเชื้อที่ได้ไปตรวจหาความเข้มข้น โดยการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ได้ และคำนวณความเข้มข้น ปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8 เพื่อเตรียมนำไปทดสอบในแปลงปลูกพืชต่อไป

3. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับหนอนผีเสื้อ วัย 2 จำนวน 30 ตัว ต่อเชื้อแต่ละไอโซเลท บันทึกข้อมูลการตายของหนอนผีเสื้อทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

4. วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 5 ซ้ำ 9 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* (ไอโซเลท DOA 45026046) อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* (ไอโซเลท DOA 45030011) อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* (ไอโซเลท DOA 45096002) อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* (ไอโซเลท DOA 45558017) อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* (ไอโซเลท DOA 45647002) อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* สายพันธุ์ aizawai อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยสารละลาย *Bt* สายพันธุ์ kurstaki อัตรา 100 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วยสารโทลเฟนไพเรด (Tolfenpyred) 16%EC อัตรา 20 ml/น้ำ 20 l

กรรมวิธีที่ 9 ไม่ควบคุมศัตรูพืช (control)

5. เตรียมแปลงปลูกคะน้าขนาด 2 x 5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร หว่านเมล็ดคะน้า 2 กิโลกรัมต่อไร่ ถอนแยกเมื่อคะน้าอายุ 15-20 วัน หลังหว่านเมล็ด ให้มีระยะระหว่างต้น 10-15 เซนติเมตร

6. ตรวจนับหนอนกระทู้ผักและหนอนใยผักเมื่อพืชอายุ 21 วัน หลังหว่านเมล็ด จำนวน 20 ต้นต่อแปลงย่อย ก่อนทำการพ่นสารตามกรรมวิธี บันทึกข้อมูล

7. พ่น *Bt* และสารเคมีตามกรรมวิธี เมื่อพบหนอนระบาดสูงกว่าระดับเศรษฐกิจ ในช่วงเย็นหลังเวลา 16.00 น. ด้วยเครื่องพ่นสะพายหลังชนิดแรงดันน้ำสูง อัตรา 120 ลิตรต่อไร่ พ่นทุก 5 วัน โดยพ่นไม่น้อยกว่า 4 ครั้ง

การบันทึกข้อมูล

- ตรวจนับจำนวนหนอนหนอนกระทู้ผักและหนอนใยผัก จำนวน 20 ต้น ต่อแปลงย่อย ก่อนพ่น *Bt* และสารเคมีตามกรรมวิธีทุกครั้ง และหลังพ่น *Bt* และสารเคมีตามกรรมวิธีครั้งสุดท้าย บันทึกข้อมูล
- บันทึกข้อมูลน้ำหนักผลผลิตที่ได้
- นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

เวลาและสถานที่

- ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558
- ห้องทดลองกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงเกษตรกรในจังหวัดกาญจนบุรี

การทดลองที่ 2.2.4 การศึกษาการพัฒนาความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของหนอนกระทู้หอม

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*
3. หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* (Hübner)
3. กล้องจุลทรรศน์
4. จานแก้วเพาะเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ
6. อาหารเทียมเลี้ยงแมลง

วิธีการ

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย Bt ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ $1x10^3$, $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$ และ $1x10^7$ cfu/ml

2. เก็บหนอนกระทู้หอมในจังหวัดกาญจนบุรี มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมจนได้หนอนรุ่น F1 จากนั้นแบ่งหนอนออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 100 ตัว หนอนกลุ่มที่ 1 คือกลุ่มของหนอนกระทู้หอมที่ให้กินเชื้อ Bta แล้วมีชีวิตอยู่รอด (Bta selected colony) โดยได้รับเชื้อ Bta ที่อัตราความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้หนอนตายประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงต่อในสภาพห้องปฏิบัติการ หนอนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มของหนอนกระทู้หอมที่ให้กินเชื้อ Btk แล้วมีชีวิตอยู่รอด (Btk selected colony) โดยได้รับเชื้อ Btk ที่อัตราความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้หนอนตายประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงต่อในสภาพห้องปฏิบัติการ

หนอนกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มของหนอนกระทู้หอมที่ไม่ได้รับเชื้อ Bt (Unselected colony) และเลี้ยงไว้ในสภาพห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

3. ทดสอบค่าความเป็นพิษของเชื้อ Bta และ Btk ทำเช่นนี้ทุกรุ่นของหนอนกระทู้หอมทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยวิธีให้กิน (Feeding Method) บนอาหารเทียม โดยหยดเชื้อ Bt ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ได้เตรียมไว้ลงบนอาหารเทียมที่เตรียมไว้ในถ้วยพลาสติกสำหรับทดสอบปริมาณ 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย ส่วนอัตราความเข้มข้นที่ใช้คัดเลือกจะใช้ตามความเหมาะสมของการตอบสนองต่อเชื้อ Bt ตลอดจนการดำรงอยู่ของกลุ่มหนอนแต่ละรุ่น นำมาทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^3$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 2. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^4$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 3. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 4. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 5. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^7$ cfu/ml
กรรมวิธีที่ 6. control

การบันทึกข้อมูล

ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีทุก 24 ชั่วโมงหลังการทดลองในแต่ละรุ่นจนครบ 7 วัน และ ถ้าพบหนอนตายใน control ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula ดังนี้

$$\% \text{ corrected mortality} = \frac{\% \text{ test mortality} - \% \text{ control mortality}}{100 - \% \text{ control mortality}} \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลจำนวนหนอนที่ตายมาหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม Probit analysis

4. นำค่า LC_{50} ของเชื้อ Bta และ Btk ที่ทดสอบกับหนอนกระทู้หอมที่เป็น selected colony มาหารด้วยค่า LC_{50} ของเชื้อ Bta และ Btk ที่ทดสอบกับหนอนกระทู้หอมที่เป็น unselected colony จะได้ค่าอัตราความต้านทาน (Resistance Ratio; RR)

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กิจกรรมย่อยที่ 2.3 การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.3.1 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรีย; *Beauveria bassiana* (Balsamo) เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

อุปกรณ์

1. เชื้อราบิวเวอเรีย (*Beauveria bassiana*) ไอโซเลทต่างๆ ได้แก่ B2 = กรมส่งเสริมการเกษตร, B4 = บิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร, BCC22355 = ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ และ BCC31578 = ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ
2. แมลงศัตรูพืชที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เพลี้ยแป้งสีชมพู เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม
3. ข้าวโพดบดหยาบ

4. Potato Dextrose Agar (PDA)
5. Potato Dextrose Broth (PDB)
6. กล่องเลี้ยงแมลง
7. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)
8. เครื่องนับสปอร์ (Hemacytometer)
9. ตู้เขี่ยเชื้อ
10. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
11. กล้องจุลทรรศน์
12. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)
13. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500, 1000 มล.
14. กระบอกตวง ขนาด 250, 500, 1000 มล.
15. ฟลาสก์ ขนาด 250, 500 มล.

วิธีการ

เลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรีย(*Beauveria bassiana*) ทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ B2 = กรมส่งเสริมการเกษตร, B4 = ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร, BCC 22355 = ศูนย์พันธุวิศวกรรม และ BCC 31578 = ศูนย์พันธุวิศวกรรม บนเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ โดยชั่งเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ 200 กรัม เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 2 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 $\pm$ 3 °ซ.) เป็นเวลา 14 วัน นำถุงเชื้อราบิวเวอเรียที่เลี้ยงได้มา เติมน้ำผสม tween ปริมาตร 200 มิลลิลิตร/ถุง เขย่าให้โคนิเดียหลุด ใช้ผ้าขาวบางกรองเศษอาหารที่ปะปนกับสารแขวนลอยโคนิเดีย จากนั้นนำสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้มาตรวจนับความเข้มข้นของโคนิเดีย ปรับกำลังโคนิเดียเชื้อให้เท่ากันทุกไอโซเลทที่ 1 X 10^8 โคนิเดีย/มล.

<u>การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรีย</u>

เพลี้ยแป้งสีชมพู *Phenacoccus manihoti* Matile-Ferrero

วิธีการ เลี้ยงเพลี้ยแป้งสีชมพูบนผลฟักทอง เลือกใช้เพลี้ยแป้งวัย 2 อายุประมาณ 1 เดือน วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดียทุกไอโซเลทที่ 1X10^8 โคนิเดีย/มล. วางแผ่นกระดาษกรองในจานเลี้ยงเชื้อหยดน้ำเพื่อเพิ่มความชื้นลงบนแผ่นกระดาษกรอง วางใบมันสำปะหลังโดยหงายหลังใบไว้ด้านบน เตรียมทรีตเมนต์ละ 5 จานเลี้ยงเชื้อ (5 ซ้ำ) นำเพลี้ยแป้งสีชมพูที่คัดเลือกไว้จุ่มในสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อแต่ละไอโซเลทที่เตรียมไว้ จากนั้นเขี่ยใส่ใบมันสำปะหลังที่เตรียม จานละ 20 ตัว ดังนั้นใช้เพลี้ยแป้งจำนวน 100 ตัว/ทรีตเมนต์ control ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตการเป็นโรคทุก 2 วัน จดบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*)

วิธีการ การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกรมการข้าวในการใช้สถานที่ทดสอบ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเพื่อใช้ในการทดสอบ วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดีย ทุกไอโซเลทที่ 1X10^8 โคนิเดีย/มล. ขั้นตอนเริ่มตั้งแต่เตรียมต้นข้าวอายุ ประมาณ 1 เดือน ใส่กระถาง (กระถางละ 15 – 20

ต้น) ใช้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลประมาณวัย 3 – 4 ในการทดสอบ ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสลบโดดใช้ CO_2 เทเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่สลบใส่จานเลี้ยงเชื้อ จานละ 10 ตัว พ่นสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราขาวไอโซเลทต่างๆ ที่เตรียมไว้บนตัวเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (พ่น 3 ครั้ง ใช้สารแขวนลอยโคนิเดียประมาณ 3 มล.) จากนั้นเขี่ยเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลใส่ต้นข้าวที่เตรียมไว้ จำนวน 10 ตัว/กอข้าว (= 1 ซ้ำ) ครอบกระถางด้วยกระบอกพลาสติก ด้านบนคลุมด้วยมุ้งตาข่าย ทำการเช็คผลทุก 2 วัน หลังการทดสอบ

หมายเหตุ: ข้าวที่ปลูกลงกระถางใช้วิธีการเพาะเมล็ด กระถางละ 15 – 20 เมล็ด (1 กอ = 15 – 20 ต้น)

หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)

วิธีการ หนอนกระทู้ผักที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัยแบคทีเรียและไวรัส กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดีย ทุกไอโซเลทที่ $1X10^8$ โคนิเดีย/มล. เลือกใช้หนอนกระทู้ผักวัย 2 ในการทดสอบ นำหนอนที่เลือกไปจุ่มในสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ที่เตรียมไว้ ส่วนcontrol ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเขี่ยใส่กล่องอาหารเทียม ทรีตเมนต์ละ 50 ตัว (5 ซ้ำ/ซ้ำละ 10 ตัว) ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตการเป็นโรคทุก 2 วัน จดบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์

หนอนกระทู้หอม *Spodoptera* exigua (Hübner)

วิธีการ หนอนกระทู้หอม ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัยแบคทีเรียและไวรัส กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ เตรียมสารแขวนลอยโคนิเดีย ทุกไอโซเลทที่ $1X10^8$ โคนิเดีย/มล. เลือกใช้หนอนกระทู้หอมวัย 3 ในการทดสอบ นำหนอนที่เลือกไปจุ่มในสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ที่เตรียมไว้ ส่วนcontrol ใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเขี่ยใส่กล่องอาหารเทียม ทรีตเมนต์ละ 50 ตัว (5 ซ้ำ/ซ้ำละ 10 ตัว) ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเป็นโรคทุก 2 วัน จดบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์

การบันทึกข้อมูล

: เก็บรวบรวมข้อมูล และจดบันทึกความผิดปกติทั้งหมดที่เกิดขึ้นระหว่างทำการทดลอง ได้แก่
  - อาการ และการเกิดโรคของแมลงที่ใช้ทดสอบ
  - ระยะเวลาที่ทำให้เกิดโรค

: วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IRRISTAT

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2556

- ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ
- ห้องปฏิบัติการสำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรมการข้าว กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 2.3.2 การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร
2. เมล็ดธัญพืชต่างๆ ได้แก่ ข้าวเปลือก, ปลายข้าว, ข้าวโพดบดหยาบ และข้าวฟ่าง
3. กากน้ำตาล (โมลาส)
4. ยูเรีย
5. Potato Dextrose Agar (PDA)
6. Potato Dextrose Broth (PDB)
7. กล่องเลี้ยงแมลง
8. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)
9. เครื่องนับสปอร์ (Hemacytometer)
10. ตู้เขี่ยเชื้อ
11. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
12. กล้องจุลทรรศน์
13. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)
14. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500, 1000 มล.
15. กระบอกตวง ขนาด 250, 500, 1000 มล.
16. ฟลาสก์ ขนาด 250, 500 มล.
17. tween 80 (0.5%)

วิธีการ

<u>วิธีการเตรียมหัวเชื้อ</u>

นำเชื้อ *B. bassiana* มาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ประมาณ 7 วัน ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อขึ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสกว้าง x ยาว = 1 x 1 ซม. ใส่ลงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 200 มล./ฟลาสก์ ในอัตรา 1 ชิ้น/1 ฟลาสก์ นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (Rotary Shaker) ความเร็วรอบประมาณ 180 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 27-28°C เป็นเวลาประมาณ 4 วัน เมื่อครบกำหนด นำเชื้อที่ได้มาตรวจหาการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย จากนั้น ดูดเชื้อจากขวดที่ผ่านการตรวจแล้วว่าไม่มีแบคทีเรียปนเปื้อนถ่ายใส่ลงในขวดอาหาร PDB ใหม่ ปริมาตร 2 มล./ ฟลาสก์ แล้วนำไปเลี้ยงซ้ำบนเครื่องเขย่าต่ออีก 4 วัน วิธีการนี้ จะได้หัวเชื้อที่มีปริมาณตั้งต้นใกล้เคียงกันในแต่ละฟลาสก์

<u>วิธีการตรวจนับการงอกของเชื้อ</u>

- โดยการเตรียมน้ำปริมาตร 100 มล. ผสม tween 80 (0.5%) 5 หยด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาเทใส่ถุงเลี้ยงเชื้อที่จะทำการตรวจสอบในอัตรา เชื้อรา 1 ถุง/น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มล. เขย่าประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้โคนิเดียหลุดออกจากเส้นใย แล้วจึงเทสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้ใส่ฟลาสก์ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อเก็บเชื้อที่ได้เป็นสารแขวนลอยตั้งต้น (stock solution) สำหรับการตรวจสอบในขั้นต่อไป

- เตรียมน้ำซึ่งผสม tween (0.5%) ใส่หลอดทดลองปริมาตร 9 มล./หลอด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้น เขย่าฟลาสก์สารแขวนลอยตั้งต้น เพื่อให้โคนิเดียกระจายตัวทั่วทั้งฟลาสก์ แล้วจึงดูดสารแขวนลอยดังกล่าวปริมาตร 1 มล. ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ เขย่าหลอดทดลองโดยใช้เครื่อง vortex เพื่อทำให้โคนิเดียเจือจางลง (dilution) โดยถือว่า ค่าการเจือจางเท่ากับ 10^{-1} ทำการเจือจางในลักษณะนี้จนถึงค่าที่ต้องการนับ

- ใช้ micropipette ดูดสารแขวนลอยสุดท้ายที่ต้องการนับ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร PDA ใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้สารแขวนลอยโคนิเดียกระจายทั่วทั้งจานเลี้ยงเชื้อทำ 10 ซ้ำ (1 ซ้ำ = 10 จานเลี้ยงเชื้อ) ปิดฝาและวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 วัน เชื้อราจะเริ่มงอกเส้นใย

- ตรวจนับโคโลนีเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาชนิดธัญพืชที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 4 กรรมวิธี

โดยใช้เมล็ดธัญพืชในการเพาะเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรีย 4 ชนิด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ข้าวเปลือก

กรรมวิธีที่ 2 ปลายข้าว

กรรมวิธีที่ 3 ข้าวโพดบดหยาบ

กรรมวิธีที่ 4 ข้าวฟ่าง

ชั่งเมล็ดธัญพืชต่าง ๆ 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวเปลือก, ปลายข้าว, ข้าวโพดบดหยาบ และข้าวฟ่าง ใส่ในถุงพลาสติกทนความร้อน ชนิดละ 10 ถุง ถุงละ 50 กรัม แต่ละถุงเติมน้ำในปริมาตร 50 มล. ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ถ่ายใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกเชื้อให้กระจายทั่วทั้งถุงอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 $\pm$ 3 $^{\circ}$C) เป็นเวลา 7-14 วัน จึงนำเชื้อที่ขึ้นมาตรวจนับจำนวนโคนิเดีย โดยนับทั้ง 10 ซ้ำๆ ละ 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย และนำสารแขวนลอยโคนิเดียมาตรวจหาการงอกของเชื้อ บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์และเปรียบเทียบความเหมาะสมของธัญพืชในการเป็นอาหารเพาะเลี้ยง โดยนับจำนวนโคนิเดีย และการงอกของเชื้อ

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาความชื้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพรบนเมล็ดธัญพืช

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี

โดยเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 1 ชั่งใส่ถุงปริมาตร 50 กรัม เติมน้ำในอัตราต่างๆ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 น้ำปริมาตร 10 มล.

กรรมวิธีที่ 2 น้ำปริมาตร 30 มล.

กรรมวิธีที่ 3 น้ำปริมาตร 50 มล.

กรรมวิธีที่ 4 น้ำปริมาตร 70 มล.

กรรมวิธีที่ 5 น้ำปริมาตร 90 มล.

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลือกเมล็ดธัญพืชที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 1 นำมาชั่งปริมาตร 50 กรัม/ถุง เติมน้ำในปริมาณที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. ตามลำดับ (10 ถุง/กรรมวิธี) ปิดถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น แบ่งอาหารที่เตรียมได้ออกเป็น 2 ส่วน

- ส่วนที่ 1 (5 ถุง/กรรมวิธี) นำอาหารในแต่ละถุงมาแบ่งชั่งน้ำหนักสดถุงละ 50 กรัม จากนั้นนำไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 103 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง แล้วเข้าสูตรเพื่อคำนวนหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารในแต่ละทรีทเมนต์

- ส่วนที่ 2 (5 ถุง/กรรมวิธี) นำหัวเชื้อที่เตรียมไว้มาถ่ายใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่เตรียมไว้แบบสุ่ม ทิ้งไว้ 7 วัน นำเชื้อที่ได้มาตรวจนับปริมาณโคนิเดีย เพื่อเปรียบเทียบหาความชื้นที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากความชื้นของอาหาร และปริมาณโคนิเดียที่ได้

ขั้นตอนที่ 3 ศึกษาความเข้มข้นโมลาสที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 6 กรรมวิธี

โดยใช้โมลาสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 โมลาส 2%
กรรมวิธีที่ 2 โมลาส 4%
กรรมวิธีที่ 3 โมลาส 6%
กรรมวิธีที่ 4 โมลาส 8%
กรรมวิธีที่ 5 โมลาส 10%
กรรมวิธีที่ 6 ไม่ใส่โมลาส (control)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ทำการทดลองโดยเลือกวิธีการที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 2 คือการเตรียมอาหารธัญพืช 50 กรัม ต่อน้ำอัตราที่เหมาะสม และเติมโมลาสในอัตราความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังกล่าว 6 กรรมวิธี ทำการทดลอง 10 ซ้ำ คลุกให้โมลาส กระจายทั่วเมล็ดธัญพืช ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกให้เชื้อ กระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 – 30 °C) เป็นเวลา 7-14 วัน จึงนำเชื้อที่ได้มานับปริมาณโคนิเดีย และการงอกของเชื้อ จากนั้นบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์ผลต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 ศึกษาปริมาณยูเรียที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ชุมพร

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 5 กรรมวิธี

โดยใช้ความเข้มข้นยูเรียในระดับต่างๆ กัน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ยูเรีย 0.5%
กรรมวิธีที่ 2 ยูเรีย 1.0%
กรรมวิธีที่ 3 ยูเรีย 1.5%
กรรมวิธีที่ 4 ยูเรีย 2.0%
กรรมวิธีที่ 5 ไม่ใส่ยูเรีย (control)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เลือกวิธีการที่ดีที่สุดจากขั้นตอนที่ 3 มาศึกษาต่อเนื่อง คือการเตรียมอาหารธัญพืช 50 กรัม ต่ออัตราน้ำและโมลาสที่เหมาะสม จากนั้นเติมยูเรียตามกรรมวิธีต่างๆ คือ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% เตรียมอาหารใส่ถุงพลาสติกทนร้อนปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 1 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 – 30 °C) เป็นเวลา 7-14 วัน จึงทำการตรวจนับปริมาณโคนิเดีย และการงอกของเชื้อ บันทึกข้อมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์

การบันทึกข้อมูล

- เก็บข้อมูลโดยการนับจำนวนโคนิเดียของเชื้อที่ผลิตได้ในอาหารแต่ละวิธีการเพื่อเปรียบเทียบปริมาณโคนิเดีย
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

เวลาและสถานที่

: เริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 2.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม; *Metarhizium anisopliae*(Metsch) Sorokin เพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก; *Phyllotreta sinuata* Stephens)

อุปกรณ์

1. เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท คือ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 และM9
2. แมลงศัตรูพืช ได้แก่ ด้วงหมัดผัก
3. ข้าวโพดบดหยาบ
4. Potato Dextrose Broth (PDB)
5. กล่องเลี้ยงแมลง
6. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)
7. เครื่องนับสปอร์ (Hemacytometer)
8. ตู้เขี่ยเชื้อ
9. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
10. กล้องจุลทรรศน์
11. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500, 1000 มล.
12. กระบอกตวง ขนาด 250, 500, 1000 มล.
13. ฟลาสก์ ขนาด 250, 500 มล.
14. สารกำจัดแมลง fipronil 5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร
15. แปลงเกษตรกรที่พบการระบาดของด้วงหมัดผัก
16. ใบกวางตุ้ง
17. เมล็ดพันธุ์ผักกาดหัว

วิธีการ

<u>การดำเนินงานในปี 2555</u>

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมในห้องปฏิบัติการ

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วย 4 ซ้ำ11 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M0
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M1
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M2
กรรมวิธีที่ 4 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3
กรรมวิธีที่ 5 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M4
กรรมวิธีที่ 6 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M5
กรรมวิธีที่ 7 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M6
กรรมวิธีที่ 8 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M7
กรรมวิธีที่ 9 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M8
กรรมวิธีที่ 10 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M9
กรรมวิธีที่ 11 น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ

เตรียมอาหาร PDA และ PDB เลี้ยงเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ทั้ง 10 ไอโซเลท เพื่อใช้เป็น stock วางแผนการทดลองแบบ CRD 11 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ใช้ด้วงหมัดผักในการทดสอบซ้ำละ 20 ตัว เลี้ยงขยายเชื้อราเขียวบนข้าวโพดบดหยาบ โดยชั่งเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ 200 กรัม เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 2 มล./ถุง คลุกให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 3 °ซ.) เป็นเวลา 14 วัน นำถุงเชื้อราเขียวที่เลี้ยงได้มาเติมน้ำผสม tween ปริมาตร 200 มิลลิลิตร/ถุง เขย่าให้โคนิเดียหลุด ใช้ผ้าขาวบางกรองเศษอาหารที่ปะปนกับสารแขวนลอยโคนิเดีย จากนั้นนำสารแขวนลอยโคนิเดียที่ได้มาตรวจนับความเข้มข้นและปรับกำลังโคนิเดียเท่ากับ 1 X 10^9 โคนิเดีย/มล. สำรวจและเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักในแหล่งที่มีการระบาดของด้วง นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เตรียมการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวไอโซเลทต่างๆ โดยเตรียมกล่องเลี้ยงแมลงขนาด 7 X 10 ซ.ม. จำนวน 44 กล่อง ใส่ฟองน้ำและต้นอ่อนกวางตุ้งลงในแต่ละกล่อง นำสำลีชุบน้ำหุ้มส่วนรากเพื่อป้องกันต้นเหี่ยว จากนั้นนำสารแขวนลอยโคนิเดียราเขียวที่เตรียมไว้ฉีดพ่นใส่ต้นอ่อนกวางตุ้ง 4 กล่อง/ไอโซเลท ปล่อยด้วงหมัดผักลงในกล่องที่เตรียมอัตรา 20 ตัว/กล่อง ปิดฝาสังเกตการเป็นโรคทุกวัน จดบันทึกข้อมูล

การบันทึกข้อมูล :

- ตรวจเช็คการเป็นโรคของด้วงหมัดผักทุกวัน เปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธี
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IRRISTAT

<u>การดำเนินงานในปี 2556</u>

การหาอัตราการใช้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมที่เหมาะสมในการควบคุมด้วงหมัดผักในสภาพไร่

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม อัตรา 100 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม อัตรา 200 กรัม/น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม อัตรา 300 กรัม/น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 fipronil 5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 น้ำเปล่า

การหาอัตราการใช้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมที่เหมาะสมในการควบคุมด้วงหมัดผักในสภาพไร่

นำเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมที่ผ่านการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการว่ามีประสิทธิภาพดีมาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ โดยเริ่มต้นจากการเลี้ยงในอาหารเหลว (PDB) ตัดชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราเขียวประมาณ 1X1 ซม. ถ่ายใส่ลงในฟลาสค์อาหารเหลว (PDB) นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180/นาที เป็นเวลานาน 4 วัน ตรวจเช็คการปนเปื้อนของเชื้ออื่นด้วยกล้องจุลทรรศน์ก่อนจะนำมาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณบนข้าวโพดบดหยาบ โดยเตรียมเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ 200 กรัม เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 5 มล./ถุง คลุกให้เชื้อ กระจายทั่วอาหาร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (27 ± 3 °ซ) เป็นเวลานาน 14 วัน เชื้อราเขียวจะเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียจนเต็มถุง นำถุงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมที่เลี้ยงได้มาล้างโคนิเดียออกโดยเติมน้ำผสม tween เขย่าให้โคนิเดียหลุด กรองแยกโคนิเดียออกจากสารแขวนลอยโคนิเดียนำมาใส่ถาดเกลี่ยให้บางนำไปอบที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 °ซ อบจนแห้งใช้เวลาประมาณ 10 ชั่วโมง เก็บใส่ขวดทึบแสงป้องกันความชื้น เพื่อนำไปใช้ในแปลงต่อไป

ติดต่อพื้นที่เพื่อทำแปลงทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมกับด้วงหมัดผัก จำนวน 2 แปลง โดยแปลงแรกติดต่อกับศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรีเพื่อขอใช้พื้นที่บริเวณแปลงศูนย์เรียนรู้ทฤษฎีใหม่ตามแนวพระราชดำริฯในศวพ.สุพรรณบุรี ส่วนแปลงที่ 2 ติดต่อหาแปลงเกษตรกรในพื้นที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี ดำเนินการโดยเตรียมแปลงปลูกผักกาดหัวใช้พื้นที่ประมาณ 600 ตารางเมตร ปรับพื้นที่แบ่งเป็น 4 ร่อง (ซ้ำ) ในแต่ละร่องแบ่งพื้นที่เป็นแปลงย่อย โดยมีขนาดแปลงย่อย 15 ตารางเมตร (5X3) ปลูกผักกาดหัวโดยวิธีหยอดเมล็ด 8 แถว/แปลงย่อย แต่ละหลุมปลูกห่างกัน 25 ซม. แต่ละแปลงย่อยมีหลุมปลูกทั้งหมด 80 หลุม (8X10) วางแผนการทดลองแบบ RCB 5 กรรมวิธี 4 ซ้ำ โดยกรรมวิธีที่ 1, 2 และ 3 ใช้ราเขียวเมตาไรเซียมในรูปผงปริมาตร 100, 200 และ 300 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ตามลำดับ กรรมวิธีที่ 4 ใช้ Fipronil 5% SC 50 มล./น้ำ 20 ลิตร และกรรมวิธีที่ 5 ใช้น้ำเปล่า เป็นตัวเปรียบเทียบตามลำดับ ทำการทดสอบโดยผสมสารจับใบ (ตามอัตราแนะนำ) ฉีดพ่นเชื้อในแปลงทุก 7 วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ หรือเท่ากับอายุเก็บเกี่ยวพืช 45 วัน เมื่อครบอายุเก็บเกี่ยว 45 วัน นำผลผลิตมาชั่งน้ำหนัก และเช็ครอยทำลายของตัวอ่อนด้วงหมัดผักบนหัวผักกาด จดบันทึกข้อมูล

การบันทึกข้อมูล :

- ตรวจเช็คการเป็นโรคของด้วงหมัดผักทุก 7 วัน
- บันทึกจำนวนด้วงหมัดผักที่พบในแต่ละกรรมวิธี
- เมื่อครบอายุเก็บเกี่ยว 45 วัน ชั่งน้ำหนักผลผลิต และเช็ครอยทำลายของตัวอ่อนด้วงหมัดผักบนหัวผักกาด
- วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ IRRISTAT

เวลาและสถานที่

: ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2556

- ห้องปฏิบัติการเชื้อราโรคแมลง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- แปลงเกษตรกร อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี
- แปลงศูนย์เรียนรู้ทฤษฎีใหม่ตามแนวพระราชดำริฯ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

การทดลองที่ 2.3.4 ประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดในการควบคุมแมลงหวี่ขาว (white fly)
วิธีดำเนินการ

1. เชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่างๆ ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* (isolate M3), *Beauveria bassiana* (สายพันธุ์ชุมพร), *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica*
2. แมลงหวี่ขาว (white fly)
3. ข้าวโพดบดหยาบ
4. Potato Dextrose Agar (PDA)
5. Potato Dextrose Broth (PDB)
6. เครื่องนับสปอร์ (Hemacytometer)
7. เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex)
8. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
9. ตู้เขี่ยเชื้อ
10. กล้องจุลทรรศน์
11. บีกเกอร์ ขนาด 250, 500, 1000 มล.
12. กระบอกตวง ขนาด 250, 500, 1000 มล.
13. ฟลาสก์ ขนาด 250, 500 มล.
14. ที่ดูดสปอร์ (Micropipet)
15. กล่องเลี้ยงแมลง
16. กรงเลี้ยงแมลง หรือ มุ้งตาข่าย
17. กระถางปลูกต้นไม้
18. เมล็ดพันธุ์มะเขือ, ต้นฝรั่ง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคแมลงต่างๆ ที่ได้ผ่านการจำแนกชนิดเชื้อแล้ว จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin, *Beauveria bassiana* (Balsamo), *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* บนเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ โดยชั่งเมล็ดข้าวโพดบดหยาบ 200 กรัม เติมน้ำ 200 มิลลิลิตร ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและหุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$C ความดัน 15 ปอนด์/ ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ใส่ในอัตรา 1 มล./ ถุง คลุกให้เชื้อ กระจายทั่วอาหาร นำไปวางบนชั้นที่อุณหภูมิห้อง (27 – 30 $^{\circ}$C) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำถุงเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดต่างๆ ที่เลี้ยงได้มาเติมน้ำผสม tween 80 (0.5%) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร/ ถุง เขย่าให้โคนิเดียหลุด แล้วปรับกำลังโคนิเดีย ให้เท่ากันทุกกรรมวิธีที่ 1 X 10^8 โคนิเดีย/มล.

2. วิธีการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

แบบและวิธีการทดลอง: วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี
ใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ โดยปรับความเข้มข้นให้เท่ากันที่ 1 X 10^8 โคนิเดีย/มล. ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *Beauveria bassiana*

กรรมวิธีที่ 2 *Isaria javanica*
กรรมวิธีที่ 3 *Metarhizium anisopliae*
กรรมวิธีที่ 4 *Paecilomyces lilacinus*
กรรมวิธีที่ 5 น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ

วิธีการ

1. เตรียมจานเลี้ยงเชื้อ จำนวน 25 จานเลี้ยงเชื้อ (5 ซ้ำ 5 กรรมวิธี) ใส่กระดาษกรอง จำนวน 1 แผ่น/จานเลี้ยงเชื้อ หยดน้ำลงบนกระดาษกรองเพื่อให้ความชื้น
2. นำสำลีจุ่มน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อพันที่ปลายก้านใบมะเขือ วางลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้
3. นำสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เตรียมไว้ในแต่ละกรรมวิธีพ่นลงบนใบมะเขือ
4. ปล่อยแมลงหวี่ขาวลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในอัตรา 20 ตัว/จานเลี้ยงเชื้อ (100 ตัว/กรรมวิธี) จากนั้นปิดจานเลี้ยงเชื้อและพันทับด้วยพาราฟิน
5. สังเกตการเป็นโรคของแมลง ทำการตรวจนับจำนวนแมลงทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ หรือจนกว่าแมลงหวี่ขาวจะตายหมด โดยนำมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อสังเกตเส้นใยและโคนิเดียเชื้อที่เกิดขึ้น นอกจากนั้นนำเชื้อที่เกิดขึ้นบนตัวแมลงมาแยกเลี้ยงลงบนอาหารเทียมเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ทดลอง จดบันทึกข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์

การบันทึกข้อมูล

- เก็บข้อมูลโดยการตรวจนับจำนวนแมลงที่เป็นโรค
- วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เวลาและสถานที่ : เริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการเชื้อราสาเหตุโรคแมลง กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

กิจกรรมย่อยที่ 4 การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.4.1. เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema riobrave*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.)
3. แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii*
4. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้อบนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
5. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tube
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth, Yeast extract, และ Tryptic soy broth
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol, formalin, hyamine
8. วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากคีบ ถาดนับไส้เดือนฝอย ผ้ากรองขนาด 48 ไมครอน เข็มเขี่ย จุกสำลี จุกยาง petridish

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่ใช้เลี้ยงด้วยแมลงอาศัย

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 2,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 2 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 2,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 3 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 3,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 4 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 3,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 5 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 4,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร
กรรมวิธีที่ 6 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 4,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ให้มีความหนาแน่นตามกรรมวิธี แล้วหยดไส้เดือนฝอยลงบนกระดาษกรองในจานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น ใส่หนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* จำนวน 10 ตัว/จานทดลอง ทำกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (จาน) จากนั้นนำจานทดลองเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ. หลังการทดลองนาน 48 ชั่วโมงนำซากหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีมาล้างด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำมาวางเรียงบนผ้าขาวบางที่ปูอยู่บนจานแก้วที่คว่ำอยู่ในกล่องพลาสติก ภายในหล่อด้วยน้ำกลั่นให้ระดับน้ำสูงประมาณ 3/4 ของความสูงของจานแก้ว เพื่อล่อไส้เดือนฝอย (Trap) หลังจากนั้นประมาณ 10 วัน เทเก็บน้ำที่มีไส้เดือนฝอยทุกวัน นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นและนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในแต่ละกรรมวิธี ก่อนเทเก็บไส้เดือนฝอยในชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 15 °ซ. นาน 2 สัปดาห์ จึงนำไส้เดือนฝอยมาทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ตามวิธีการของ Miller (1989) โดยใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ (ถาด) ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง

การบันทึกผล

- บันทึกจำนวนหนอนกินรังผึ้งที่ตายในแต่ละกรรมวิธี ที่เวลา 48 ชั่วโมง
- จำนวนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง ในแต่ละกรรมวิธี

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น(Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 10,000 ตัว
กรรมวิธีที่ 2 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 20,000 ตัว
กรรมวิธีที่ 3 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 30,000 ตัว
กรรมวิธีที่ 4 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 40,000 ตัว

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารไข่ ประกอบด้วย ไข่ไก่ 10 ฟอง น้ำมันหมู 220 มล. น้ำกลั่น 331 มล. และฟองน้ำ 140 กรัม ผสมส่วนผสมต่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร แล้วนำมาขยำรวมกับชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดลูกเต๋า ชั่งอาหารเทียมใส่ในใส่ขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. ขวดละ 40 กรัม ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียร่วมอาศัย *X. cabanillasii* และนำไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในอาหารเทียมด้วยวิธีปลอดเชื้อ

ตามกรรมวิธี ตั้งขวดเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ บันทึกการพัฒนาของไส้เดือนฝอย จนไส้เดือนฝอยพัฒนาเจริญเติบโตเป็นวัย 3 ระยะ IJ 95-100% จึงทำการล้างเก็บผลผลิตและนับจำนวน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอย ที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละวิธีการในทุกการกรรมวิธี

การทดลองที่ 3 ศึกษาวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษาต่ออายุและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*

วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลง อัตรา 10 ล้านตัว/น้ำ 10 มล. นำมาผสมกับวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษา 3 ชนิด คือ ฟองน้ำสังเคราะห์ ดินเหนียว และโพลิเมอร์ ผสมให้ไส้เดือนฝอยเข้ากับวัสดุเก็บในถุงพลาสติกขนาด 4x6 นิ้ว ปิดปากถุงให้สนิท เก็บที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส ทุก 30 วัน ทำการตรวจการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยในแต่ละกรรมวิธี ทำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2554 – เดือนกันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก

การดำเนินงานแบ่งเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1. เพิ่มปริมาณหนอนด้วงหมัดผัก

เก็บรวบรวมตัวเต็มวัยด้วงหมัดผักแถบลาย จากแปลงเกษตรกร นำมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกใสใบกวางตุ้งเพื่อเป็นพืชอาหาร นำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติที่อุณหภูมิ 27 + 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 70-80 % RH. แยกเลี้ยงไข่และหนอนในกล่องพลาสติก ขนาด 4x7x9 ซม. โดยมีต้นกล้ากวางตุ้งขนาดเล็กที่มีรากสมบูรณ์ เป็นอาหาร

ขั้นตอนที่ 2. เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *S. riobrave, S. siamkayai,* และ *S. carpocapsae*

เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยด้วยหนอนกินรังผึ้ง โดยใส่ไส้เดือนฝอย อัตรา 2,000 ตัวในน้ำ 1 มล. หยดลงบนกระดาษกรองในจานพลาสติก ที่ใส่หนอนกินรังผึ้งจานละ 10 ตัว เก็บจานพลาสติกที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้น 48 ชั่วโมง นำซากหนอนมา Trap ในกล่องชื้น เพื่อล่อไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงออกจากซากหนอน เทเก็บไส้เดือนฝอยก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

ขั้นตอนที่ 3. ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในการควบคุมด้วงหมัดผัก

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. riobrave*, *S. siamkayai* และ*S. carpocapsae* ในการควบคุมหนอนด้วงหมัดผัก

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 3 กรรมวิธี ทำการทดลองด้วยวิธี soil bioassay ตามวิธีการของ Glazer *et al.* (2002) ใส่ทรายที่อบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วในถาดหลุม หลุมละ 1 กรัม ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด จำนวน 100 ตัวในน้ำ 60 ไมโครลิตรต่อหลุม และใส่หนอนด้วงหมัดผัก หลุมละ 1 ตัว นำถาดหลุมเก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายใน เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง หนอนที่ตายนำมาวางในกล่องชื้นเก็บที่ 30 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย 3 ชนิดในด้วงหมัดผัก

3.2 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการควบคุมด้วงหมัดผักระยะต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ด้วยวิธี soil bioassay ใส่ทรายที่อบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 1 กรัม รองก้นถาดหลุม ขนาด 24 หลุมต่อถาด หยดไส้เดือนฝอย อัตรา 1,10, 20, 50,100, 200 ตัวในน้ำ

60 ไมโครลิตร ก่อนใส่หนอนด้วงหมัดผัก หลุมละ 1 ตัว เก็บที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจนับหนอนด้วงหมัดผักที่ตายภายในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ทำการทดสอบกับดักแด้ และตัวเต็มวัยด้วงหมัดผัก โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับหนอนด้วงหมัดผัก)

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนหนอนด้วงหมัดผักที่ตายภายในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง
- จำนวนไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) ที่ออกจากตัวหนอนมาอยู่ในน้ำที่หล่อไว้ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน
- ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่เหมาะสม

การทดลองที่ 2.4.3. วิจัยและพัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย
3. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ pH meter, moisture analyzer เครื่องเขย่า
4. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ กระบอกตวง จานเลี้ยงเชื้อ
6. สารเคมี ได้แก่ ฟอร์มาลีน แอลกอฮอล์
7. ฟองน้ำสังเคราะห์ ถุงพลาสติก
8. อาหารสุนัข น้ำมันหมู

การทดลองย่อยที่ 1 ศึกษาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* ด้วยแมลงอาศัย (2554)

1 ศึกษาปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยแมลงอาศัย

นำไส้เดือนฝอย *S. glaseri* 3 ระยะเข้าทำลายแมลง มาเจือจางในน้ำกลั่นอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้อัตราความหนาแน่นประมาณ 3000 2000 1000 200 100 และ 10 ตัว/น้ำ 0.4 มล. หยดลงบนกระดาษกรองในจานพลาสติก-จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (วัย 5 - 6) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ในห้องปฏิบัติการ จำนวน 10 ตัว ปล่อยลงไปในจานพลาสติกที่หยดไส้เดือนฝอยแล้ว ปิดฝานำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ หลังจากนั้น 24-48 ชั่วโมง หนอนจะตาย จึงเก็บหนอนมาล้างด้วยน้ำสะอาดนำซากหนอนเหล่านั้น มาวางบนจานแก้วปูด้วยผ้ากรอง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °ซ ทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วัน ไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโต อยู่ภายในตัวหนอนจนกระทั่งพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) จึงออกจากซากหนอนลงสู่น้ำที่หล่อไว้-ทำการเก็บไส้เดือนฝอยที่ได้จากน้ำที่หล่อไว้นั้น โดยเทเก็บวันเว้นวันใส่ในภาชนะ และเติมน้ำสะอาดหล่อไว้ใหม่จนซากหนอนแห้ง ประมาณ 4-5 ครั้ง

- **การบันทึกข้อมูล**
- ปริมาณหนอนที่ตายในแต่ละอัตราความหนาแน่น
- ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากหนอน1 ตัว
- คุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่ละความหนาแน่น

การทดลองย่อยที่ 2 ศึกษาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว(2555-2556)

2.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยใช้สูตรอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ซึ่งประกอบด้วย อาหารสุนัข น้ำมันหมู หนอนกินรังผึ้ง ฟองน้ำสังเคราะห์และน้ำ โดยใช้วิธีการเลี้ยงของวัชรี (2544) ดังนี้

1.นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บรรจุใน flask จำนวน 45 กรัม ปิดจุกสำลี นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2.เมื่ออาหารเย็นลง เติมแบคทีเรียร่วมอาศัยที่เลี้ยงขยายใน Ys broth เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยจำนวน 3 มล. นำเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.เติม ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* วัย 3 ระยะ IJ ลงเลี้ยงในอัตรา 5000 ตัวต่อ flask เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ จึงทำการเก็บผลผลิต

บันทึกผล

- ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้

2.2 ศึกษาปริมาณ inoculum ของไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ในการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยใช้สูตรอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ซึ่งประกอบด้วย อาหารสุนัข น้ำมันหมู หนอนกินรังผึ้ง ฟองน้ำสังเคราะห์และน้ำ โดยใช้วิธีการเลี้ยงของวัชรี (2544) ดังนี้

1.นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บรรจุใน flask จำนวน 45 กรัม ปิดจุกสำลี นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2.เมื่ออาหารเย็นลง เติมแบคทีเรียร่วมอาศัยที่เลี้ยงขยายใน Ys broth เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยจำนวน 3 มล. นำเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.เติม ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* วัย 3 ระยะ IJ ลงเลี้ยงในอัตรา 4,000 5,000 และ 6,000 ตัวต่อ flask เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ จึงทำการเก็บผลผลิต

บันทึกผล

- ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้

2.3 ศึกษาผลของแบคทีเรียร่วมอาศัยต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยใช้สูตรอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว ซึ่งประกอบด้วย อาหารสุนัข น้ำมันหมู หนอนกินรังผึ้ง ฟองน้ำสังเคราะห์และน้ำ โดยใช้วิธีการเลี้ยงดังนี้

1.นำส่วนผสมทั้งหมดผสมให้เข้ากัน บรรจุใน flask จำนวน 45 กรัม ปิดจุกสำลี นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที จำนวน 60 flask

2.เมื่ออาหารเย็นลง เติมแบคทีเรียร่วมอาศัยที่เลี้ยงขยายใน Ys broth เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยจำนวน 3 มล.ต่อ flask จำนวน 30 flask นำเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.เติม ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* วัย 3 ระยะ IJ ลงเลี้ยงในอัตรา 5,000 ตัวต่อ flask เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ จึงทำการเก็บผลผลิต

บันทึกผล

- ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้
- คุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่รอบการผลิต
- ข้อมูลต้นทุนการผลิต

การทดลองย่อยที่ 3 ศึกษาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า(2556-2558)

3.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

1.เลี้ยงไส้เดือยฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยใช้สูตรอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต0.75%วิตามิน และเกลือแร่ 0.50% ไขมัน0.20% Emulsifier6.67% และน้ำสะอาด100 %

เตรียมส่วนผสมอาหารดังกล่าวให้เข้ากัน แล้วบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 500 มล. ขวดละ 40 มล. ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำอาหารออกจากตู้อบ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเลี้ยงไส้เดือนฝอยต่อไป

2.เมื่ออาหารเย็นลง เติมแบคทีเรียร่วมอาศัยที่เลี้ยงขยายใน Ys broth เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยจำนวน 3 มล.ต่อ flask จำนวน 30 flask นำเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.หลังจากเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียในอาหารเหลวแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไส้เดือนฝอยลงเลี้ยง โดยนำต้นเชื้อไส้เดือนฝอยที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้ว อัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. แล้วใส่ลงในขวดอาหารเหลวด้วยวิธีปลอดเชื้อนำไปเลี้ยงต่อโดยเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 12 วัน

4.ทำการตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งจะหยุดกินอาหาร ปากจะปิด และส่วนหางจะยาวแหลม โดยเมื่อพบเป็นจำนวนมากกว่า 95% จึงทำการเก็บผลผลิต

3.2 ศึกษาผลของปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงไส้เดือยฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเหลว โดยใช้สูตรอาหารเหลวที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* วัย 3 ระยะ IJ ลงเลี้ยงในอัตรา 4,000 5,000 และ 6,000 ตัวต่อ flask เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-15 วัน เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ จึงทำการเก็บผลผลิต

3.3 ศึกษาผลของแบคทีเรียร่วมอาศัยต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมเหลว โดยใช้วิธีการเลี้ยงดังนี้

- 1.เตรียมอาหารเทียม บรรจุใน flask จำนวน 45 กรัม ปิดจุกสำลี นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที จำนวน 60 flask

- 2.เมื่ออาหารเย็นลง เติมแบคทีเรียร่วมอาศัยที่เลี้ยงขยายใน Ys broth เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยจำนวน 3 มล.ต่อ flask จำนวน 30 flask นำเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 3.เติม ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* วัย 3 ระยะ IJ ลงเลี้ยงในอัตรา 5,000 ตัวต่อ flask เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ จึงทำการเก็บผลผลิต
- **การบันทึกข้อมูล**
  - ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้
  - คุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่รอบการผลิต
  - ข้อมูลต้นทุนการผลิต

การทดลองย่อยที่ 4 ทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* ควบคุมแมลงศัตรูพืช (2558)

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในดาวเรือง

- วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี
- กรรมวิธีที่ 1 พ่นไส้เดือนฝอย *S. glaseri* อัตรา 20 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
- กรรมวิธีที่ 2 พ่นไส้เดือนฝอย *S. glaseri* อัตรา 30 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
- กรรมวิธีที่ 3 พ่นไส้เดือนฝอย *S. glaseri* อัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
- กรรมวิธีที่ 4 พ่นไส้เดือนฝอย *S. glaseri* อัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
- กรรมวิธีที่ 5 พ่น BT อัตรา 80 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร
- กรรมวิธีที่ 5 ไม่ควบคุมศัตรูพืช(control)

พ่นไส้เดือนฝอย ในแปลงปลูกดาวเรืองขนาดแปลงย่อย 15 ตารางเมตร อัตราความเข้มข้นต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยใช้เครื่องพ่นสารสะพายหลังแบบแรงดันน้ำสูง โดยพ่นในระยะที่ดาวเรืองติดดอก และพบหนอนเฉลี่ย 1 ตัวต่อดอก จำนวน 5 ครั้ง โดยตรวจนับปริมาณหนอนที่พบทั้งก่อนและหลังพ่นไส้เดือนฝอยจำนวน 20 ดอกต่อแปลงย่อย ในแต่กรรมวิธีเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

- การบันทึกผลการทดลอง
- -บันทึกจำนวนแมลงที่พบทั้งก่อนและหลังพ่นไส้เดือนฝอย

การทดลองย่อยที่ 5 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาไส้ดือนฝอย *Steinernema glaseri* (2556-2558)

เก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ที่ผลิตได้ในชิ้นฟองน้ำ โดยบรรจุไส้เดือนฝอยในอัตรา $4x10^6$ ตัว $2x10^6$ ตัว $1x10^6$ ตัว และ $5x10^5$ ตัว เก็บที่อุณหภูมิ 6 และ 15 องศาเซลเซียส ตรวจนับอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงทุกเดือน

การบันทึกข้อมูล

-อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. glaseri*

-ประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลง

ระยะเวลาและสถานที่

-เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

-ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลอง 2.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

วิธีการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผง
2. สารฆ่าแมลง fipronil 5% sc
3. เครื่องพ่นสารแบบสะพายหลัง
4. กระบอกตวง

การทดลองย่อยที่ 1. ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิ(2554-2556)

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการเข้าทำลายหนอนเจาะดอกมะลิ ในห้องปฏิบัติการ

นำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ระยะเข้าทำลายแมลง มาเจือจางในน้ำกลั่นอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้อัตราความหนาแน่นประมาณ 500 1000 และ 2000 ตัว/น้ำ 1 มล. หยดลงบนกระดาษกรองในจานพลาสติกจากนั้นนำหนอนเจาะดอกมะลิที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวน 20 ตัว ปล่อยลงไปในจานพลาสติกที่หยดไส้เดือนฝอยแล้ว ปิดฝานำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซหลังจากนั้น 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลปริมาณหนอนที่ตายในแต่ละอัตราความหนาแน่น

ทดสอบอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยบนต้นมะลิ หลังจากพ่นไส้เดือนฝอย ในสภาพโรงเรือน

ปลูกมะลิในกระถางกระถางละ 3 ต้น จนมะลิเริ่มออกช่อดอก ทำการพ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร เก็บช่อดอกมะลิจำนวน 10 ช่อดอก มาตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยหลังจากพ่น 1 2 และ3 วัน บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอยที่ยังมีชีวิตอยู่

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิในสภาพไร่

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 20 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 30 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารฆ่าแมลง fipronil 5% sc อัตรา 40 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 ไม่ควบคุมศัตรูพืช(control)

พ่นไส้เดือนฝอย ในแปลงปลูกมะลิอัตราความเข้มข้นต่างๆ ตามกรรมวิธีที่กำหนด โดยพ่นในระยะที่มะลิติดดอก จำนวน 5 ครั้ง สุ่มนับตรวจนับปริมาณหนอนที่พบทั้งก่อนและหลังพ่นไส้เดือนฝอยในแต่กรรมวิธีจาก 50 ช่อดอกต่อแปลง ในแปลงย่อยขนาด 15 ตารางเมตร เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

การบันทึกข้อมูล

-จำนวนแมลงที่พบทั้งก่อนและหลังพ่นไส้เดือนฝอย
-ต้นทุนการใช้สารฆ่าแมลงและไส้เดือนฝอย
-อัตราการใช้น้ำต่อไร่

การทดลองย่อยที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว(2556-2558)

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 20 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 2 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 3 พ่นไส้เดือยฝอยชนิดบรรจุในชิ้นฟองน้ำอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 4 พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารฆ่าแมลง fipronil 5% sc อัตรา 40 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ไม่ควบคุมศัตรูพืช(control)

พ่นไส้เดือนฝอย ในแปลงปลูกขนาดแปลงย่อย 2x5 ตารางเมตร เมื่อผักกาดหัวอายุ 0, 10, 20 และ 30 วัน อัตราความเข้มข้นตามกรรมวิธีที่กำหนด ส่วนในกรรมวิธีพ่นด้วยสารฆ่าแมลง พ่นเมื่อพบด้วงหมัดผักระบาดเฉลี่ย 1 ตัวต่อผักกาดหัว 20 ต้น ตรวจนับปริมาณด้วงหมัดผักที่พบทั้งก่อนและหลังพ่นไส้เดือนฝอยในแต่กรรมวิธีเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติ

การบันทึกข้อมูล

-จำนวนแมลงที่พบทั้งก่อนและหลังพ่นไส้เดือนฝอย

-ต้นทุนการใช้สารฆ่าแมลงและไส้เดือนฝอย

-อัตราการใช้น้ำต่อไร่

ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการการทดลอง

-เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558

-ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

-โรงเรือนกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

-แปลงเกษตรกร จ.ชลบุรี และนนทบุรี

การทดลองที่ 2.4.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ชนิดผง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.)
3. แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus nematophila*
4. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้อบนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
5. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tube
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth, Yeast extract, และ Tryptic soy broth
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol, formalin, hyamine,
8. วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากคีบ ถาดนับไส้เดือน**ฝอย**

วิธีการ

1. การเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*

โดยการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย ในอาหารสูตร TSB3 (วัชรี และสุทธิชัย, 2544) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ วางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน จึงทำการเก็บไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง โดยการล้างตกตะกอน เทเก็บไส้เดือนฝอยใส่ในฟองน้ำสังเคราะห์ในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมสูตรสำเร็จต่อไป

2. การเตรียมผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง

นำสารแขวนลอยของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง จำนวน 50 ล้านตัว ผสมกับดินสูตรของวัชรี และสุทธิชัย (2544) ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในถุงพลาสติกเก็บในตู้เย็น เพื่อนำใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. ทดสอบผลของสารเสริมประสิทธิภาพต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง

นำสารเสริม 2 ชนิด ได้แก่ ไคโตซาน และ กัม ในอัตราชนิดละ 0.05 และ 0.1% มาผสมกับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* จากข้อ 2 จำนวน 100 กรัม ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม ก่อนนำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในกระป๋องพลาสติกขนาด 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ทำสูตรละ 3 ซ้ำ) ทำตรวจการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอย ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงและทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ทุก 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 สัปดาห์

4. ทดสอบขนาดบรรจุต่อความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย S. carpocapsae ชนิดผง

ศึกษาขนาดบรรจุไส้เดือนฝอยชนิดผง 4 ระดับ ได้แก่ 10, 15, 20 และ 25 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทุก 2 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างไส้เดือนฝอยจำนวน 1 กรัมนำมาละลายน้ำและตรวจการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller 1989

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิต
- จำนวนหนอนตายที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยตามวิธีมาตรฐานของ Miller (1989)
- จำนวนหนอนตายที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยโดยวิธี Soil bioassay ตามวิธีการของ Glazer *et al*. (2000)

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2554 – เดือนกันยายน 2557

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลอง 2.4.6 เทคนิคการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

- อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica*
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA, YS broth, อาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง
4. สารเคมี glycerin, แอลกอฮอล์
5. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ จานแก้ว, แท่งแก้วสามเหลี่ยม, ออโตไปเปท, eppendopf, ขวดแก้ว
6. วัสดุอื่นๆ สำลี, แท่งเหล็กสำหรับเขี่ยเชื้อ

- วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การศึกษาเทคนิคและทดสอบปัจจัยที่เหมาะสม ต่อการเก็บรักษาต้นเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

คัดแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica*

วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี

1. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 33%
2. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 50%
3. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 66%

- เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหนอนที่ตายมาตัดขา ใช้ loop แตะ haemolymph แล้วขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA ในจานแก้ว นำเก็บที่อุณหภูมิ 28°ซ จากนั้นคัดเลือก 1 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth ปริมาตร 150 มล. ในขวดแก้วขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกลีเซอรีนลงในขวดแบคทีเรียตามปริมาตรในแต่ละกรรมวิธี นำเก็บรักษาตามวิธีการ Cryopreservation ตรวจและเก็บบันทึกข้อมูลผลการทดสอบ ทุกๆ 1 เดือนวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ (แยกทดสอบ และวิเคราะห์ผลในแต่ละชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัย)

การบันทึกข้อมูล

- นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate

ขั้นตอนที่ 2. การศึกษาเทคนิคและทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

ทดสอบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica* (แยกทดสอบ และวิเคราะห์ผลในแต่ละชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง) โดยวางแผนการทดลองแบบมี 2 ปัจจัย 4x4 factorial in CRD 3 ซ้ำ 16 กรรมวิธี

ปัจจัยที่ 1 อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ระดับต่างๆ 4 ระดับ คือ

1. 5,000 ตัว/หลอด
2. 10,000 ตัว/หลอด
3. 50,000 ตัว/หลอด
4. 100,000 ตัว/หลอด

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรีนสำหรับเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 4 ระดับ คือ

1. 10%
2. 14%
3. 18%
4. 22%

เลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) เก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (Infective Juvenile) หลังออกจากซากแมลงอาศัย 1-3 วัน จากนั้นกรองไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อกำจัดเศษซากหนอนและสิ่งสกปรกออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดด้วย 0.1% ฟอร์มาลีน และ 0.1% ไฮยามีน ในครั้งสุดท้ายเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เตรียมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบในแต่ละปัจจัย ในสารละลายกลีเซอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามปัจจัยที่ต้องการทดสอบ จากนั้นนำเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ 72 ชั่วโมง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* ก่อนนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไปตามวิธีการ Cryopreservation ตรวจผลการทดสอบโดยสุ่มตัวอย่างทุกเดือน บันทึกข้อมูลผลการทดสอบ วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ

บันทึกผลการทดลอง

- นับจำนวนและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
- ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง)

- เวลาและสถานที่

- ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2558
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Result and Discussion)

กิจกรรมย่อยที่ 2.1. การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช
การทดลองที่ 2.1.1พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง
ผลการทดลอง
การทดลองย่อยที่ 1. เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

จากการเพาะเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง จาก Embryonic stem cell จากหนอนแรกเกิด เปรียบเทียบ 4 ชนิด ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม ตามเทคนิควิธีการของ สุชลวัจน์ (2545) เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27 $^{\circ}$C ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 อัตราการเลี้ยงขยายเซลล์ (sub-culture) 1:5 ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. ทำการ sub-culture 3-4 วัน/ครั้ง คัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงให้มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) มากกว่า 80% เพื่อให้ได้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น 5 เท่า ภายใน 4 วัน ใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น (starter cells) และตรวจดูความต่อเนื่องของการเจริญของเซลล์ พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ต้นแบบได้ตามเทคนิควิธีการนี้ โดยมีค่าร้อยละการเจริญที่สูงสุดของเซลล์ เซลล์หนอนใยผักที่ 90.21 % หนอนเจาะสมอฝ้ายที่ 90.05 % เซลล์หนอนกระทู้ผัก ที่ 91.25 % และเซลล์หนอนกระทู้หอม 91.45 % (ตารางที่ 1) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ซึ่งต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงพัฒนาเพื่อให้ได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) จึงจะนำไปใช้ในการทดลองที่ 2 ต่อไป

การควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า แถบของดีเอ็นเอเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงอยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลความเหมือนกัน

ตารางที่ 1. ร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) มากกว่า 80%

แหล่งที่เก็บตัวอย่างแมลง	ร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability)			
	เซลล์หนอนใยผัก	เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้าย	เซลล์หนอนกระทู้ผัก	เซลล์หนอนกระทู้หอม
1. กาญจนบุรี	90.21	90.05	91.25	91.45
2. นครราชสีมา	-	85.90	-	-
3. นนทบุรี	-	-	87.35	-
4. กรุงเทพฯ	-	-	83.25	-

การทดลองย่อยที่ 2. เพาะเลี้ยงไวรัสจากเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

ดำเนินการต่อจากการทดลองย่อยที่ 1. เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ จนกระทั่งได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) แล้ว และ การควบคุมคุณภาพไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า แถบของดีเอ็นเอไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ

ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง อยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลความเหมือนกันต่อไป

การทดลองที่ 2.1.2 พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ

ผลการทดลอง

นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่เจริญในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 เพาะเลี้ยงในสภาวะค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 ที่อุณหภูมิ 27 $^{\circ}$C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน เปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 25-28 $^{\circ}$C ระยะเวลา 12 ชั่วโมง/วัน ตรวจหาค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) และตรวจดูความต่อเนื่องของการเจริญของเซลล์ พบว่า เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิต่างๆสภาพแวดล้อมกัน เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตแบ่งเซลล์ได้ดี ที่อุณหภูมิห้อง 25-28 $^{\circ}$C (12 ชั่วโมง/วัน) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ได้ ส่วนที่ควบคุมอุณหภูมิ 5 $^{\circ}$C ระยะเวลา 24 ชั่วโมง/วัน เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 5 $^{\circ}$C ยังไม่ได้เซลล์ต้นแบบที่มีอัตราการเจริญที่ดีกว่าวิธีการเดิมที่เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 27 $^{\circ}$C และ การตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า แถบของดีเอ็นเอเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงอยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลความเหมือนกัน และ ควรเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาซึ่งจะยืนยันผลได้ดียิ่งขึ้น

การทดลองที่ 2.1.3 การพัฒนารูปแบบชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม

ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การศึกษาคุณสมบัติไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้หอม ในสภาพอุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อดูผลของอุณหภูมิกับระยะเวลาต่างๆต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ผลการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวีสด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 92.88, 87.57 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ รองลงมาเป็นเชื้อที่บ่มในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชม. โดยไม่แตกต่างจากเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 ชม.และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 85.8, 86.56, 81.45 และ 80.95 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อบ่มเชื้อไว้นานขึ้นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชม. จะทำให้เชื้อไวรัสมีประสิทธิภาพลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกับเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 72.93 และ 62.01เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 72 ชม. เชื้อจะมีประสิทธิภาพต่ำสุดมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 49.08 เปอร์เซ็นต์ (Table 1)

เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (Original activities remainding percentage; % OAR) จาก Table 1 ซึ่งได้จากอัตราส่วนของเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากอุณหภูมิต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนด้วยเชื้อสด พบว่าให้ผลที่สอดคล้องเช่นเดียวกับผลเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน โดยเชื้อ

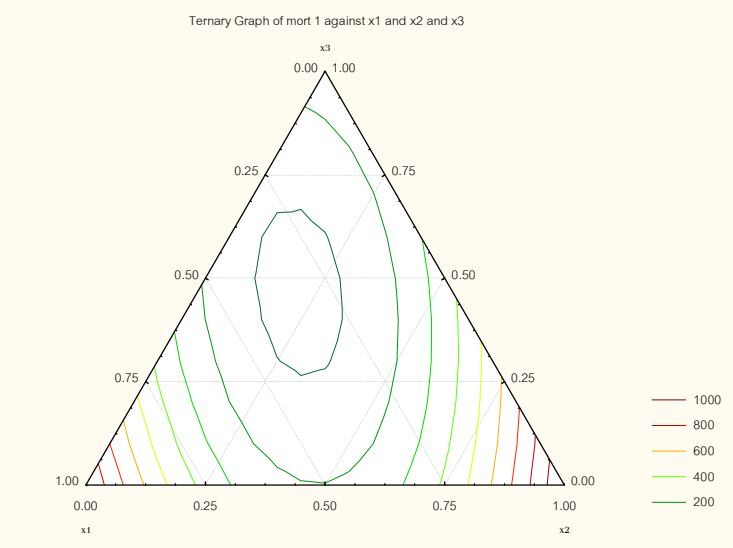
ไวรัส เอ็นพีวี สามารถทนต่ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นานถึง 72 ชม. มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (% OAR) ระหว่าง 91.11-98.56 เปอร์เซ็นต์ และเมื่ออุณหภูมิที่บ่มสูงขึ้นค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดก็จะลดลงตามระยะเวลาและอุณหภูมิที่สูงขึ้น มีค่า % OAR ระหว่าง 52.07-91.85 เปอร์เซ็นต์ ดังเช่นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชม. จะมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเหลือเพียง 86.43 เปอร์เซ็นต์ หรือเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส เชื้อจะอยู่ได้นานเพียง 24 ชม. มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด 85.89 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อระยะเวลานานขึ้นกว่านี้ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดก็จะลดลงต่ำกว่ามาตรฐาน เมื่อใช้มาตรฐานของประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงที่ 80 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Gudauskas and Canerday (1968) ที่กล่าวถึงไวรัส เอ็นพีวีของหนอน *Heliothis* ที่เป็นหนอนในตระกูลเดียวกัน คือ Family Noctuidae จะลดประสิทธิภาพลงอย่างรวดเร็วเมื่อเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที และประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวีของหนอน *Trichoplusia* ลดลง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิสูงมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสเอ็นพีวี แต่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสเช่นกัน

ขั้นตอนที่ 2 การพัฒนาสูตรผงสำเร็จรูปด้วยสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ

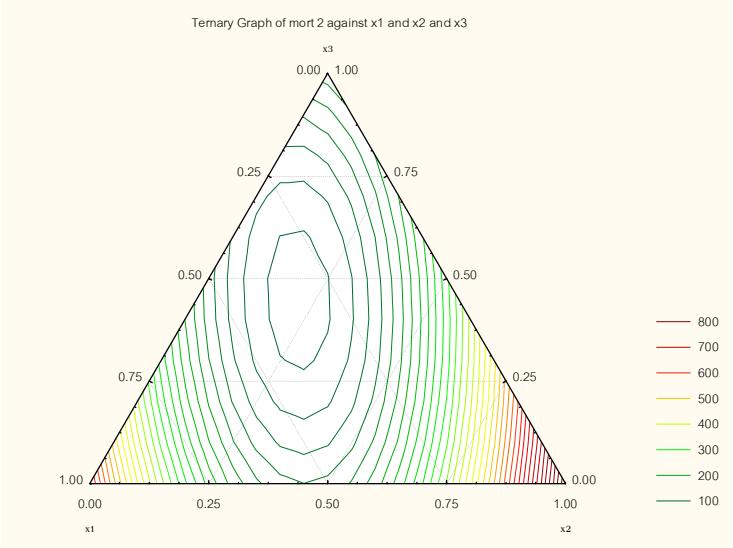
ผลการทดลองจาก Table 2 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนครั้งที่ 1 พบว่า สูตรที่ 1-7 มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 78.3-90.0 เปอร์เซ็นต์ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ 8 และ 9 มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 71.7 และ76.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนครั้งที่ 2 พบว่าทุกสูตรมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนไม่แตกต่างกัน มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 88.3-98.3 เปอร์เซ็นต์

ข้อมูลที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพของสูตรที่ระดับต่างๆใน Table 2 นำมาหาเค้าโครงส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ด้วยการนำมาสร้างสมการถดถอย quadratic model เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ค่าประสิทธิภาพการกำจัดหนอนกับปัจจัยที่ทำการศึกษา คือ ปริมาณส่วนผสมทั้ง 3 ชนิด แสดงไว้ใน Table 3

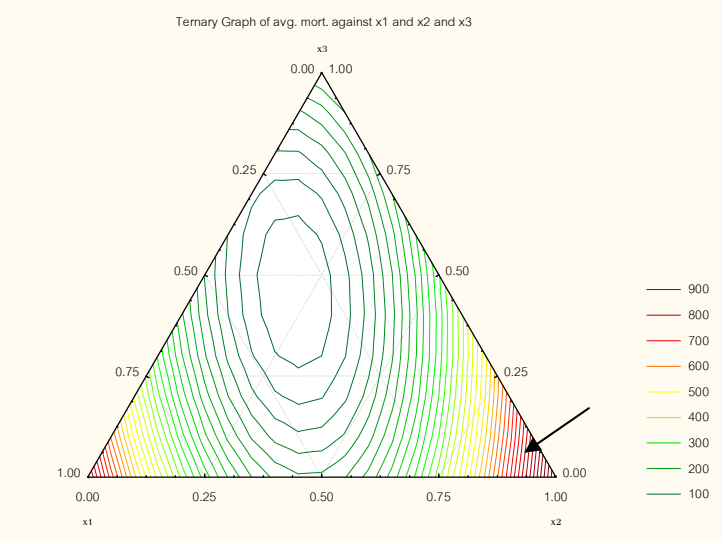
จาก Table 3 เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร x_i ในสมการรีเกรสชั่นพบว่า Kaolin มีค่าสัมประสิทธิ์สูงที่สุด รองลงมาคือ Skim milk และ Surfactant ตามลำดับ แสดงว่า Kaolin มีผลต่อสูตรผสมเชื้อไวรัส เอ็นพีวี มากที่สุด รองลงมาคือ Skim milk และ Surfactant ตามลำดับ เมื่อนำสมการถดถอยจาก Table 3 มาสร้างกราฟ contour plot ดังแสดงใน Fig 1 โดยเลือกจากพื้นที่ที่มีค่าคะแนน V มากที่สุดเป็นเกณฑ์กำหนดในการคัดเลือกพื้นที่ที่เหมาะสม



a) mortality 1



b) mortality 2



c) avg.mortality

Fig.1 Contour plot for Skim milk, Kaolin, Surfactant and Optimum overlapping.

จาก Fig.1 ในกราฟ C ซึ่งเป็นกราฟที่เกิดจากการซ้อนกันของกราฟ a และ b เป็นพื้นที่ที่มีความเหมาะสมของส่วนผสมชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี (จุดที่ลูกศรชี้) โดยมีปริมาณ Skim milk จะอยู่ในช่วงร้อยละ 35-36, ปริมาณ Kaolin จะอยู่ในช่วงร้อยละ 29-30 และปริมาณ Surfactant จะอยู่ในช่วงร้อยละ 48-50

ขั้นตอนที่ 3 การผลิตสูตรสำเร็จรูปชนิดผง

เมื่อได้อัตราส่วนผสมของชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ในขั้นตอนที่ 2 แล้ว จึงนำส่วนผสมทั้งหมดไปอบแห้ง จะได้ผลผลิตชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดผงประมาณ 550 กรัม แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมวัย 3 โดยศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพไวรัส เอ็นพีวี สูตรต่างๆ ได้แก่ สูตรผง สูตรน้ำมัน เปรียบเทียบกับสูตรมาตรฐานที่ผลิตแจกจ่ายอยู่เดิมคือ ไวรัส เอ็นพีวี DOA BIO V1 ผลการทดสอบในครั้งที่ 1 พบว่า ไวรัส เอ็นพีวี ทุกสูตรมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมโดยพบว่า ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมสูตรมาตรฐาน มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนสูงที่สุดถึง 100 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม สูตรผง สูตรน้ำมัน และเชื้อสด มีเปอร์เซ็นต์หนอนตายเฉลี่ย 96.01, 94.00 และ 92.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีควบคุมไม่พบการตายของหนอน เมื่อทำการทดลองซ้ำในครั้งที่ 2 พบว่า ทุกกรรมวิธีของการใช้ไวรัส มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์เท่ากันหมด ส่วนกรรมวิธีควบคุมไม่พบการตายของหนอนเช่นเดียวกัน (Table 4)

ขั้นตอนที่ 4 การทดสอบในสภาพไร่

ทำการทดสอบในสภาพไร่ในพืชคะน้า โดยพ่นเชื้อไวรัสสำเร็จรูปที่ผลิตได้ คือ เชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอมชนิดผง ชนิดน้ำมัน และไวรัสสำเร็จรูปที่ผลิตอยู่เดิม DOA BIO V1 จำนวน 2 ครั้ง พบว่า เมื่อพ่นเชื้อไวรัสครั้งที่ 1 จำนวนหนอนก่อนพ่นสารไม่มีความแตกต่างทางสถิติ พบหนอนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 21.25-22.00 ตัวต่อคะน้า 20 ต้น เมื่อพ่นเชื้อไวรัสไปแล้ว 3, 5 และ 7 วัน พบว่าการพ่นเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีจำนวนหนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติ พบหนอนเฉลี่ย 14.25-17.75, 7.50-10.50 และ 1.00-3.00 ตัวต่อคะน้า 20 ต้น ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแปลงควบคุมที่ไม่พ่นสาร พบหนอนเฉลี่ย 29.50, 27.25, และ 26.25 ตัวต่อคะน้า 20 ต้น ตามลำดับ

เมื่อพ่นเชื้อไวรัสครั้งที่ 2 พบว่ามีผลการทดลองที่ไม่แตกต่างจากการพ่นสารครั้งที่ 1 มีจำนวนหนอนก่อนพ่นสารไม่มีความแตกต่างทางสถิติ พบหนอนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 15.50-18.75 ตัวต่อคะน้า 20 ต้น และเมื่อพ่นเชื้อไวรัสไปแล้ว 3, 5 และ 7 วัน พบว่าการพ่นเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีจำนวนหนอนไม่แตกต่างกันทางสถิติ พบหนอนเฉลี่ย 5.00-6.50, 3.50-5.50 และ 3.00-6.00 ตัวต่อคะน้า 20 ต้น ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแปลงควบคุมที่ไม่พ่นสาร พบหนอนเฉลี่ย 13.50, 21.00, และ 17.50 ตัวต่อคะน้า 20 ต้น ตามลำดับ

จากการทดสอบในสภาพไร่ ได้แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์เชื้อไวรัสที่ได้ทั้ง 2 สูตร คือ สูตรผง ที่ไม่จำเป็นต้องผ่านการอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) โดยการทำให้เชื้อแห้งด้วยด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียล ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมทนได้ ทำให้มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่าเดิม และสูตรน้ำมันที่มีการผลิตที่ง่ายขึ้นเพื่อให้ตัวผลิตภัณฑ์มีการแพร่กระจายดีขึ้น โดยมีส่วนผสมที่ลดลงเพื่อลดต้นทุนการผลิต เมื่อเทียบกับชีวภัณฑ์สำเร็จรูป DOA BIO v1 ที่ผลิตอยู่เดิม

Table 1 Temperature effect to efficacy of SeNPV with different time *against* *S. exigua* larvae.

Temp (°C)	Time (hr.)	% mortality[1/]	% OAR[2/]
30 °C	24	92.88±0.52 a[3/]	98.56
	48	87.57±0.43 ab	92.92
	72	85.8 ±0.62 b	91.11
40 °C	24	86.56±0.72 b	91.85
	48	81.45±0.80 bc	86.43
	72	72.93±0.84 c	77.39
50 °C	24	80.95±0.82 bc	85.89
	48	62.01±0.62 c	65.80
	72	49.08±0.82 d	52.07
เชื้อสด	-	94.24±0.23 a	100
น้ำกลั่น	-	0 e	-
CV (%)	-	10.08	-

1/ mortality percentage of larvae adjust by Abbott's formula

2/ % Original Activity Remaining (% OAR), all virus treatments were compared to crude virus where % OAR 5 100.0%.

3/ Means fellowed by the same small letter (within the column) and capital letter (within the rows) do not differ significantly at 95 % by DMRT

Table 2 Laboratory evaluation of several subtancesused as additives formulated with SeNPV and bioassayed against against *S. exigua* larvae.

Formulation	Factor levels[1/]			% mortality 1	% mortality 2	% avg. mortality
	X_1	X_2	X_3			
1.	0.30	0.30	0.40	85.0 a[2/]	98.3	91.7
2.	0.35	0.30	0.35	85.0 a	96.7	90.9
3.	0.40	0.30	0.30	88.3 a	95.0	91.7
4.	0.40	0.23	0.37	87.3 a	94.0	90.7
5.	0.40	0.15	0.45	90.0 a	98.3	94.2
6.	0.35	0.15	0.50	78.3 ab	90.0	84.2
7.	0.30	0.15	0.55	81.7 ab	95.0	88.4
8.	0.30	0.23	0.47	71.7 b	88.3	80.0
9.	0.35	0.23	0.42	76.7 b	90.3	83.5
C.V. (%)	-	-	-	18.6	ns	-

1/ X_1 = Skim milk, X_2 = Kaolin, X_3 = Surfactant

2/ Means fellowed by the same small letter (within the column) and capital letter (within the rows) do not differ significantly at 95 % by DMRT

Table 3 Predictive regression models of larvae mortality in Mixture design experiment

Dependent variable; V	Predictive Model	R^2
Mortality 1	$V=907.76X_1+1006.08X_2+268.22X_3-3018.52X_1X_2-1600\ X_1\ X_3+1114.68X_2X_3$	.510
Mortality 2	$V=623.05X_1+840.33X_2+210.21X_3+2265.42X_1X_2-993.33X_1X_3+840.60X_2X_3$	.428
Overall mortality	$V=8.456X_1+2.396X_2+16.808X_3+37.216\ X_1\ X_2-11.341\ X_1\ X_3+40.155\ X_2\ X_3$	.562

v = Response or mortality percentage, X_1 = Skim milk, X_2 = Kaolin, X_3 = Surfactant A

Table 4 Bioassay evaluate against *S. exigua* larvae with SeNPV

กรรมวิธี	อัตรา	เปอร์เซ็นต์หนอนตายครั้งที่ 1 1/	เปอร์เซ็นต์หนอนตายครั้งที่ 2 1/	เฉลี่ย
1. SeNPV สูตรผง	30	96.01 a 2/	100	98.0
2. SeNPV สูตรน้ำมัน	30	94.00 a	100	97.0
3. SeNPV (DOA BIO V1)	30	100 a	100	100
4. SeNPV เชื้อสด	30	92.01 a	100	96.0
5. control (น้ำกลั่น)	-	0 b	0	0
C.V. (%)		5.79	-	-

1/ mortality percentage of larvae adjust by Abbott's formula

2/ Means fellowed by the same small letter (within the column) and capital letter (within the rows) do not differ significantly at 95 % by DMRT

Table 5 Efficacy evaluate against Beet army worm larvae with various SeNPV bioproducts on Chinese kale

Treatment	Rate per 20 l.	Number of larvae per 20 plants[1/]							
		1st Before spray	After spray 1(day)			2nd Before spray	After spray 2 (day)		
			3	5	7		3	5	7
1. SeNPV (powder)	30	21.25	17.75 a	10.50 a	3.00 a	15.50	6.50 a	5.50 a	6.00 a
2. SeNPV (oil)	30	23.00	17.00 a	7.50 a	2.00 a	17.50	6.25 a	4.50 a	5.75 a
3. SeNPV (DOA BIO V1)	30	21.25	14.25 a	7.75 a	1.00 a	18.75	5.00 a	3.50 a	3.00 a
4. control	-	22.00	29.50 b	27.25 b	26.25 b	18.00	13.50 b	21.00 b	17.50 b
C.V. (%)		7.01	9.86	14.08	18.87	15.07	22.15	21.34	26.08

1/ Means fellowed by the same small letter (within the column) and capital letter (within the rows) do not differ significantly at 95 % by DMRT

การทดลองที่ 2.1.4 การเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ชนิดต่างๆด้วยเทคนิค Microencapsulation

จากการศึกษาภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ทำให้เห็นลักษณะพื้นผิวของผลึกโปรตีนได้ละเอียดชัดเจน พบว่ามีลักษณะพื้นผิวเป็นร่องขรุขระเล็กๆ ซึ่งเป็นร่องที่เกิดจากการฝังตัวของ virions ในผลึกโปรตีน ผลึกโปรตีนเหล่านี้มีหลายรูปแบบ แต่ส่วนใหญ่จะพบเป็นรูปทรงกลม และมีขนาดที่แตกต่างกัน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.7-2.8 ไมครอน (Fig.1) เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไวรัสชนิดนี้เป็นชนิด multiple embedded เนื่องจากในผลึกโปรตีนมี virion ที่ประกอบด้วยอนุภาคไวรัสตั้งแต่ 1 หรือมากกว่า 1 อนุภาคในผนัง 2 ชั้นที่ล้อมรอบ ซึ่ง virion ก็คือ อนุภาคไวรัส (nucleocapsid) ที่มีผนังล้อมรอบแล้ว และขนาดของวิริออนก็จะขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคไวรัส (Fig.2)

เมื่อทำการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ด้วยวิธี Starch-encapsulation ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Dunkle และ Shasha (1988) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดัดแปร (modified tapioca strach) ที่มีคุณลักษณะเป็น pregelatinization ด้วยการให้ความร้อนกับแป้งที่แขวนลอยในน้ำ จากนั้นทำให้แห้งด้วยความร้อน แป้งพรีเจลาติไนซ์จะมีความหนืดและ adhesiveness ต่ำกว่าแป้งสุกที่เตรียมใหม่ๆ ช่วยให้อนุภาคถูกเกาะติดกับสารชนิดอื่นได้ดีขึ้น เมื่อทำการเคลือบอนุภาคไวรัสกับสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ ได้แก่ Titanium dioxide, Congo red, Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk ผลการศึกษาพบว่า ปรากฏฟิล์มบางๆล้อมรอบอนุภาคไวรัสจากสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆทุกชนิดอย่างชัดเจน (Fig.3-7) เมื่อเปรียบเทียบภาพของอนุภาคไวรัสก่อนเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวี (Fig.2) เมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงให้เห็นว่าการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี ด้วยสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ สามารถใช้เทคนิค starch-encapsulation ได้ดี

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการป้องกันรังสียูวี ด้วยการละลายน้ำ แล้วเคลือบเป็นแผ่นฟิล์มบางๆบน plate ก่อนนำไปผ่านแสงยูวี ชนิดบี ตามระยะเวลาที่กำหนด อนุภาคไวรัสที่ผ่านการเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวีเหล่านี้ เมื่อนำไปทดสอบความทนทานต่อแสงยูวีกับหนอนกระทู้หอมวัย 3 พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ไวรัสสด (Cruded virus) และกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น โดยประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมจะลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับแสงยูวี กล่าวคือ ที่ระยะเวลา 6 ชม. อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Congo red, molassee, Skim milk และ Carbon charcoal แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยมีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ย 68.2, 62.0, 54.6, 52.0, 50.4, 32.6 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อผ่านแสงยูวีเป็นเวลา 12 ชม. ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมเริ่มลดลง แต่ทุกกรรมวิธีก็ยังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide และ Congo red มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยมีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ย 60.1, 57.2, 48.8, 40.2, 38.0, 20.4 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเมื่อผ่านแสงยูวีเป็นเวลา 24 ชม. ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมลดลงอย่างชัดเจนและทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่นเช่นเดิม โดยไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide และ Congo red มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย molassee, Carbon charcoal และ Skim milk แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยมีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ย 50.0, 48.6, 40.1, 30.4, 29.3, 12.0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาในภาพรวมที่ 24 ชม.

จะพบว่า ไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide มีประสิทธิภาพสูงสุดเพียง 50.0 เปอร์เซนต์ รองลงมาเป็นกรรมวิธีที่เคลือบสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆที่เหลือซึ่ง มีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 48.6-29.3 เปอร์เซนต์ แต่ยังคงมีประสิทธิภาพสูงกว่า ไวรัสสดที่มีประสิทธิภาพเพียง 12.0 เปอร์เซนต์ (Table 1)

เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส (Original activity remaining percent ;% OAR) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่เคลือบด้วยสารป้องกันแสงยูวี ชนิดต่างๆ และได้รับแสงยูวี ณ เวลาที่ศึกษา กับค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่เคลือบด้วยสารป้องกันแสงยูวี แต่ไม่ได้รับแสงยูวี ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 24 ชม. อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide และ Congo red มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส สูงที่สุดถึง 54.1 และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีเหลือได้แก่ Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส เท่ากับ 42.4, 33.7 และ 31.4 ตามลำดับ โดยเชื้อไวรัสสด มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส เหลือเพียง 13.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 2)

จากการศึกษาของสมชัยและคณะ (2556) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของสารป้องกันรังสียูวีชนิดเดียวกับการทดลองนี้ไปผสมกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี โดยไม่ผ่านการเคลือบอนุภาคไวรัส เมื่อผ่านแสงยูวี ชนิดบี พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสจะยังคงมีประสิทธิภาพได้เพียง 3 ชม. โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยระหว่าง 85.0-89.2 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากนั้นเชื้อไวรัสจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในทุกกรรรมวิธี แต่การศึกษานี้ได้เพิ่มระยะเวลาของการรับแสงยูวีให้นานขึ้นถึง 24 ชม. แม้ว่าเชื้อจะผ่านแสงยูวีนานถึง 6 ชม. เชื้อไวรัสที่ผ่านการเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวีก็ยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการเคลือบอนุภาคไวรัสด้วยสารป้องกันรังสียูวี ด้วยเทคนิค Starch-encapsulatin สามารถยืดระยะเวลาให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้นานขึ้นกว่าการผสมเชื้อกับสารป้องกันรังสียูวีแบบธรรมดา สอดคล้องกับการศึกษาของ Ignoffo และ Batzer.(1971) ที่รายงานถึงการเคลือบอนุภาคไวรัสด้วยสารป้องกันรังสียูวีโดยเทคนิค Starch-encapsulation จะช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอดได้นานขึ้นในสภาพธรรมชาติที่มีแสงแดดเป็นตัวทำลายเชื้อไวรัส ซึ่งจะช่วยให้เชื้อไวรัสสามารถกำจัดหนอนได้นานขึ้นกว่าเดิม แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบในสภาพไร่ที่มีปัจจัยแวดล้อมจำนวนมากเพื่อให้สามารถยืนยันผลที่ชัดเจนต่อไป

Table 1 Mean percentage mortality of Starch-encapsulated *Spodotera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) formulated with UV protectants and exposed to simulated sunlight UV for different period of time.

Treatment	**% mortality of larvae after UV exposure**[1]		
	6 hr.	**12 hr.**	**24 hr.**
1. Titanium dioxide	68.2± 3.3 a[2] A[3]	60.1± 2.6 aAB	50.0±4.3 aB
2. Congo red	62.0± 2.1 aA	57.2± 1.3 aA	48.6± 3.2 aB
3. Molase	54.6± 3.8 abA	48.8± 1.4 b AB	40.1± 1.6 bB
4. carbon charcoal	50.4± 2.9bA	40.2± 1.5 bcB	30.4± 0.8 cC
5. Skim milk	52.0± 1.3 abA	38.0± 0.7 cB	29.3± 1.5 cC
6. Crude virus	32.6± 4.2 cA	20.4± 0.8 dB	12.0± 1.2 dC
7. Distilled water	0 d	0 e	0 d
C.V. (%)	13.2	18.6	10.4

[1] Percentage mortaliy of larvae adjusted by Abbott's formula

[2,3] Means fellowed by the same small letter (within the column) and capital letter (within the rows) do not differ significantly at 95 % by DMRT

Table 2 Mean percentage mortality and percentage original activity remaining of Starch-encapsulated *Spodotera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) formulated with or without UV protectants and exposed to sunlight 24 hr.

UV protectant[1]	UV treatment[2]	% mortality of larvae[3]		% OAR[4]
		Means	± SE	
1.Titanium dioxide	treated untreated	50.0 92.4	4.3 2.4	54.1
2.Congo red	treated untreated	48.6 91.2	3.2 1.2	53.3
3. Molase	Treated untreated	40.1 94.5	1.6 2.5	42.4
4.carbon charcoal	treated untreated	30.4 90.3	0.8 3.4	33.7
5.Skim milk	treated untreated	29.3 93.2	1.5 2.0	31.4
6.Cruded virus	treated untreated	12.0 90.0	1.2 2.6	13.3
7.Distilled water	untreated	0	0	0

[1] Includes starch-encapsulated SeNPV and UV protectant.

[2] Treat sample were exposed to simulated sunlight UV and untreat sample were not exposed to simulated sunlight UV.

[3] Mortality of Spodoptera exigua larvae after 10 days at 25± 2 $^{\circ}$C

[4] Percentage of the original activity remaining based on ratio between treated and untreated mortality after exposure for 24 hr to simulated sunlight UV.

ภาคผนวก

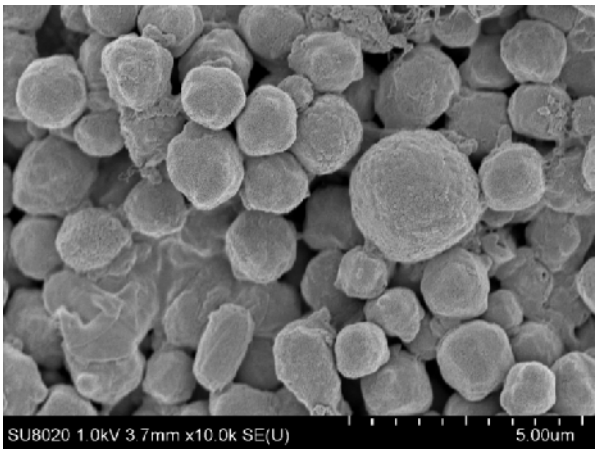


Fig 1 Scanning electron microscope of occlusion bodies of SeNPV

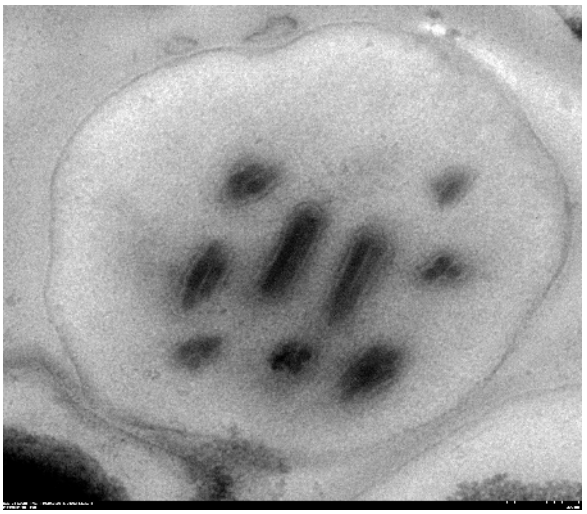


Fig 2 Transmission eletron micrograph of occlusion bodies of SeNPV

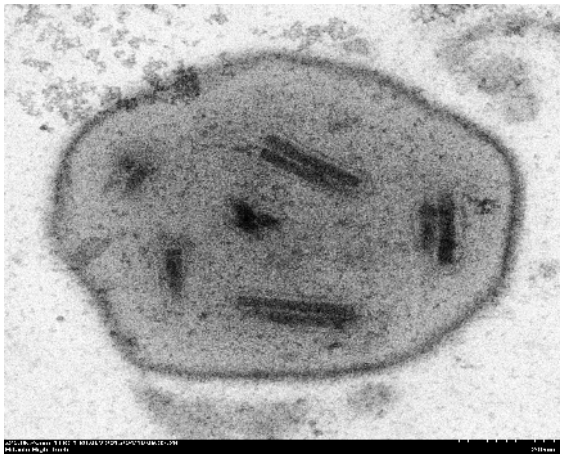


Fig 3 Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Titanium dioxide

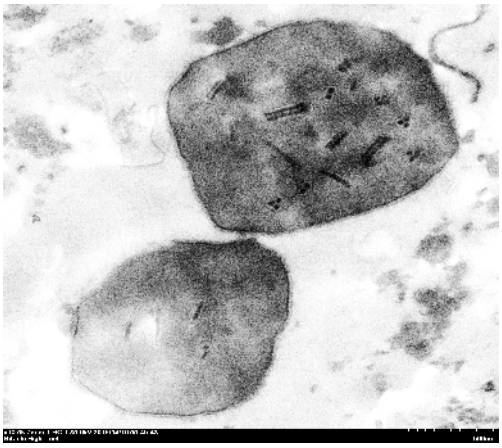


Fig 4 Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Congo red

Fig 5 Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Molasses

Fig 6 Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Carbon charcoal

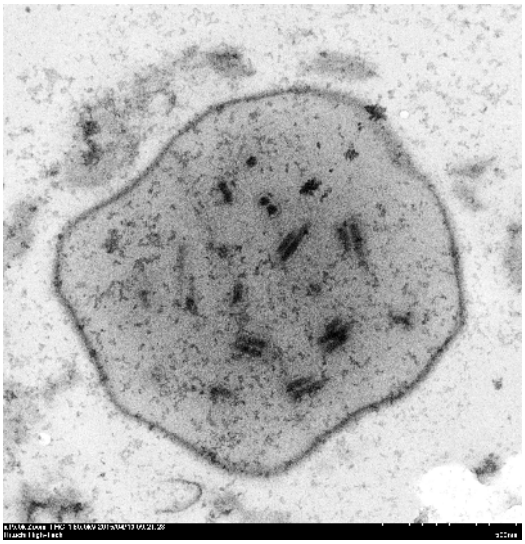


Fig 7 Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Skim milk

การทดลองที่ 2.1.5 ศึกษาชีววิทยาของโปรโตซัวที่เข้าทำลายระบบการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัส Nucleopolyhedrovirus และการควบคุม

ผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการแยกเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์

จากการคัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่แสดงอาการติดเชื้อโปรโตซัว โดยลำตัวมีสีผิดปกติ ขาวซีด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาต่างๆ เพื่อทำเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ และใช้น้ำตาลซูโครส ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์และเศษซากหนอนที่เหลืออยู่ ทำให้ได้เชื้อโปรโตซัวที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมานับจำนวนโปรโตซัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณเชื้อโปรโตซัวจากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและระยะเวลาต่างๆ

อัตราความเร็วและระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยง	ปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่ได้ (PIBs/ml)
1. 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที	57.09×10^7
2. 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 20 นาที	53.75×10^7
3. 1,500 rpm 5 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที	56.11×10^7
4. 1,500 rpm 5 นาที และ 2,000 rpm 20 นาที	54.86×10^7
5. 1,500 rpm 5 นาที และ 3,000 rpm 10 นาที	58.47×10^7
6. 1,500 rpm 5 นาที และ 3,000 rpm 20 นาที	54.86×10^7
7. 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที	61.11×10^7
8. 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที	38.75×10^7

จากตารางจะพบว่าการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11×10^7 PIBs/ml การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวน้อยที่สุด คือ 38.75×10^7 PIBs/ml ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำเชื้อโปร

โตซัวให้บริสุทธิ์ได้ แต่ทุกกรรมวิธี ไม่มีแตกต่างทางสถิติ การใช้ความเร็วรอบ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด

2. ศึกษาปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ

จากการทดสอบเชื้อโปรโตซัวกับหนอนกระทู้ผัก วัย 1 ไม่สามารถบันทึกผลการทดลองได้ เนื่องจากหนอนกระทู้ผักวัย 1 มีขนาดเล็ก อ่อนแอ เมื่อมีการเขี่ย หรือเคลื่อนย้ายหนอนหลายครั้ง หนอนกระทู้ผักตายเป็นจำนวนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถชั่งน้ำหนักหนอนได้เพราะมีขนาดเล็กประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร แม้จะใช้เครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง จึงทำการทดสอบหนอนกระทู้ผักวัย 2 -5 เชื้อโปรโตซัวความเข้มข้น $1x10^{2}$ $1x10^{4}$ $1x10^{6}$ $1x10^{8}$ และ $1x10^{10}$ cell/ml กับหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ โดยให้หนอนกินอาหารเทียมที่มีเชื้อโปรโตซัว ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 2 3 4 และ 5 ที่ได้รับเชื้อปริมาณต่างๆ

ปริมาณเชื้อโปรโตซัว (cell/ml)	อายุเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักก่อนเข้าดักแด้ (วัน)				น้ำหนักเฉลี่ยของดักแด้ (กรัม)			
	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5
น้ำกลั่น	14.50	11.50	7.55	5.50	0.3360	0.3516	0.2897	0.2884
$1x10^{2}$	16.40	11.55	11.55	5.50	0.3600	0.3457	0.3457	0.2714
$1x10^{4}$	15.90	12.20	7.05	5.85	0.3348	0.3305	0.2586	0.2977
$1x10^{6}$	14.70	10.95	7.20	5.85	0.3551	0.3503	0.2937	0.2837
$1x10^{8}$	18.25	10.40	7.15	5.90	0.2862	0.3304	0.2946	0.2810
$1x10^{10}$	19.00	11.25	6.80	5.30	0.2816	0.3504	0.2790	0.2649

จากตารางพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวที่ความเข้มข้นต่างๆ วัย 2 ใช้เวลาการเจริญเติบโตในระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ประมาณ 15-19 วัน วัย 3 11-13 วัน วัย 4 7-12 วัน และวัย 5 ประมาณ 6 วัน ซึ่งในแต่ละวัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยของหนอนทุกวัยอยู่ที่ 0.2186 – 0.3600 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 2 3 4 และ 5 รุ่น ลูก (F1) ที่ได้รับเชื้อปริมาณต่างๆ

ปริมาณเชื้อโปรโตซัว (cell/ml)	อายุเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักก่อนเข้าดักแด้ (วัน)				น้ำหนักเฉลี่ยของดักแด้ (กรัม)			
	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5
น้ำกลั่น	11.65	12.85	9.90	11.15	0.3575	0.3464	0.3883	0.3564
$1x10^{2}$	15.80	14.17	11.55	12.10	0.3319	0.3069	0.3921	0.3416
$1x10^{4}$	12.63	12.55	10.35	11.65	0.3729	0.3510	0.3292	0.3311
$1x10^{6}$	8.00	12.56	11.40	11.15	0.3480	0.3419	0.3606	0.3535
$1x10^{8}$	-	15.21	11.60	10.95	-	0.3648	0.3968	0.3534
$1x10^{10}$	-	12.90	12.25	10.85	-	0.3436	0.3802	0.3483

จากตารางพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มบันทึกผลเมื่อหนอนอายุประมาณ 4 -5 วัน (อยู่ในวัย 2) พบว่าหนอนวัย 2 (F1) ใช้เวลาการเจริญเติบโตในระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ประมาณ 8-16 วัน วัย 3 (F1) 13-16 วัน วัย 4 (F1) 10-13 วัน และวัย 5 (F1) ประมาณ 11-13 วัน ซึ่งในแต่ละวัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักระหว่างวัยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยของหนอนทุกวัยอยู่ที่ 0.3069 – 0.3968 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ส่วนหนอนกระทู้ผักวัย 2 ที่กินเชื้อโปรโตซัวความเข้มข้น $1x10^{8}$ และ $1x10^{8}$ (cell/ml) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงรุ่นลูก (F1) ได้

การทดลองที่ 2.1.6 การใช้สูตรผสมไวรัส NPV ร่วมกับแบคทีเรีย Bt ในการควบคุมหนอน ผีเสื้อศัตรูกุหลาบ

ผลการทดลอง

<u>การทดลองที่ 1</u> จากการทดลองนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* มาใช้ร่วมกับไวรัส NPV ของแมลงศัตรูพืช 2 ชนิด คือ *Helicoverpa armigera* (HaNPV) และ *Spodoptera litura* (SlNPV) โดยทดลองกับหนอนทั้ง 2 ชนิด มีผลการทดลองดังนี้

1.1 หนอนเจาะสมอฝ้าย พบว่า หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 และ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, ไวรัส HaNPV ที่อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตรและcontrol มีการตายของหนอน 5.00, 7.50, 5.00, 25.00, 32.50, 20.00 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส HaNPV อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตาย 80.00, 90.00, 67.50 และ 37.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส HaNPV อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตายของหนอน 60.00,

62.50, 67.50 55.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 และ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, ไวรัส HaNPV ที่อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตรและcontrol มีการตายของหนอน 25.00 12.50, 72.50, 95.00, 95.00, 72.50และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส HaNPV อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตาย 95.00, 100, 92.50 และ 70.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส HaNPV อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตายของหนอน 87.50, 95.00, 97.50 และ 85.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 และ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, ไวรัส HaNPV ที่อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตรและcontrol มีการตายของหนอน 70.00, 42.50, 97.50, 100, 100, 100 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส HaNPV อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตาย 97.50, 100, 100 และ 97.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส HaNPV อัตรา 40, 30, 20 และ 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตายของหนอน 95.00 97.50 97.50 และ 95.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จากการทดลองพบว่า ในช่วงระยะเวลา 3 วัน ทุกอัตราของเชื้อ Bt มีการตายของหนอน 5.00 – 7.50 เปอร์เซ็นต์ และทุกอัตราของไวรัส HaNPV มีการตายของหนอน 5.00 – 32.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผสมทุกอัตราของเชื้อ Bt และทุกอัตราของไวรัส HaNPV มีการตายของหนอนเจาะสมอฝ้ายเพิ่มขึ้นมากกว่าการใช้เชื้อ Bt หรือไวรัส HaNPV เพียงอย่างเดียว

1.2 หนอนกระทู้ผัก จากการทดลองพบว่า หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 และ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, ไวรัส SlNPV ที่อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และcontrol มีการตายของหนอน 8.00, 0, 0, 0, 5.00, 0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส SlNPV อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตาย 0, 5.00, 17.50 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส SlNPV อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตายของหนอน 2.50, 0, 5.00 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 และ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, ไวรัส SlNPV ที่อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และcontrol มีการตายของหนอน 25.00, 0, 2.50, 0, 7.50, 0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส SlNPV อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตาย 0, 12.50, 35.00 และ 25.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส SlNPV อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตายของหนอน 5.00, 2.50, 7.50 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 และ 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร, ไวรัส SlNPV ที่อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และcontrol มีการตายของหนอน 35.00, 2.50, 37.50, 17.50, 35.00, 5.00 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส SlNPV อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตาย 15.00, 30.00, 57.50 และ 35.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับไวรัส SlNPV อัตรา 50, 40, 30 และ 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร มีการตายของหนอน 42.50 30.00 35.00 และ 32.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

<u>การทดลองที่ 2</u> การทดลองใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับไวรัส SlNPV ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในแปลงกุหลาบ มีผลการทดลองดังนี้ (ตารางที่ 3)

จากการตรวจนับจำนวนแมลงก่อนพ่นสารทดลองพบว่าใน วิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร วิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร วิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร วิธีการใช้ ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร และวิธีการไม่พ่นสาร มีจำนวนหนอนกระทู้ผัก 11.75, 12.00, 12.25, 12.75 และ13.00 ตัวตามลำดับ หลังการพ่นสารครั้งที่ 1 เป็นเวลา 7 วัน ได้ทำการตรวจนับหนอนกระทู้ผักในแปลง พบว่ามีจำนวนหนอน 6.75, 7.50, 6.25, 5.75 และ 11.75 ตัวตามลำดับ โดยปริมาณหนอนที่พบในทุกวิธีการพ่นสารมีความแตกต่างทางสถิติกับวิธีการไม่พ่นสาร โดยวิธีการใช้ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตร ให้ผลในการควบคุมหนอนได้ดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ วิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตร และวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร แต่แตกต่างทางสถิติกับ วิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตรที่ให้ผลควบคุมหนอนได้ต่ำที่สุด หลังจากการพ่นสารครั้งที่ 2 สำรวจพบหนอน 0.50, 0.75, 0.25, 0.25 และ 4.50 ตัวตามลำดับ โดยปริมาณหนอนที่พบในทุกวิธีการพ่นสารไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จะแตกต่างทางสถิติกับวิธีการไม่พ่นสาร และเมื่อทำการเก็บผลผลิตดอกกุหลาบในแปลงทดลอง (ตารางที่ 4) พบว่าได้จำนวนดอกในแต่ละกรรมวิธี 981, 965, 1,060, 1,067 และ 1,055 ดอกตามลำดับ โดยมีจำนวนดอกที่ถูกหนอนเจาะทำลายจำนวน 33, 24, 39, 39 และ 54 ดอกตามลำดับ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ดอกที่เสียหายแล้วพบว่าวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 40 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์ดอกเสียต่ำที่สุดจำนวน 2.48 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตร วิธีการใช้ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตร และวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์ดอกเสีย 3.36, 3.37 และ 3.68 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และวิธีการไม่พ่นสารจะมีเปอร์เซ็นต์ดอกเสียสูงที่สุด คือ 5.12 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 การตายของหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* วัยที่ 3 จากการกินอาหารเทียมที่เคลือบผิวหน้าด้วยเชื้อ Bt และไวรัส HANPV

กรรมวิธี	หนอนตาย (%)		
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
เชื้อ Bt อัตรา 80 มล./น้ำ 20 ลิตร	5.00	25.00	70.00
เชื้อ Bt อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	7.50	12.50	42.50
ไวรัส HANPVอัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	5.00	72.50	97.50
ไวรัส HANPVอัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร	25.00	95.00	100
ไวรัส HANPVอัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร	32.50	95.00	100
ไวรัส HANPVอัตรา 10 มล./น้ำ 20 ลิตร	20.00	72.50	100
Bt 80 มล.+HANPV 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	80.00	95.00	97.50
Bt 80 มล.+HANPV 30 มล./น้ำ 20 ลิตร	90.00	100	100
Bt 80 มล.+HANPV 20 มล./น้ำ 20 ลิตร	67.50	92.50	100
Bt 80 มล.+HANPV 10 มล./น้ำ 20 ลิตร	37.50	70.00	97.50
Bt 40 มล.+HANPV 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	60.00	87.50	95.00
Bt 40 มล.+HANPV 30 มล./น้ำ 20 ลิตร	62.50	95.00	97.50
Bt 40 มล.+HANPV 20 มล./น้ำ 20 ลิตร	67.50	97.50	97.50
Bt 40 มล.+HANPV 10 มล./น้ำ 20 ลิตร	55.00	85.00	95.00
control	0	0	0

ตารางที่ 2 การตายของหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* วัยที่ 3 จากการกินอาหารเทียมที่เคลือบผิวหน้า ด้วยเชื้อ Bt และไวรัส SLNPV

กรรมวิธี	หนอนตาย (%)		
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
เชื้อ Bt อัตรา 80 มล./น้ำ 20 ลิตร	8.00	25.00	35.00
เชื้อ Bt อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	0	2.50
ไวรัส SLNPV อัตรา 50 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	2.50	37.50
ไวรัส SLNPV อัตรา 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	0	17.50
ไวรัส SLNPV อัตรา 30 มล./น้ำ 20 ลิตร	5.00	7.50	35.00
ไวรัส SLNPV อัตรา 20 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	0	5.00
Bt 80 มล.+ SLNPV 50 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	0	15.00
Bt 80 มล.+ SLNPV 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	5.0	12.50	30.00
Bt 80 มล.+ SLNPV 30 มล./น้ำ 20 ลิตร	17.50	35.00	57.50
Bt 80 มล.+ SLNPV 20 มล./น้ำ 20 ลิตร	10.00	25.00	35.00
Bt 40 มล.+ SLNPV 50 มล./น้ำ 20 ลิตร	2.50	5.00	42.50
Bt 40 มล.+ SLNPV 40 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	2.50	30.00
Bt 40 มล.+ SLNPV 30 มล./น้ำ 20 ลิตร	5.00	7.50	35.00
Bt 40 มล.+ SLNPV 20 มล./น้ำ 20 ลิตร	0	10.00	32.50
control	0	0	0

ตารางที่ 3 จำนวนหนอนกระทู้ผักในแปลงกุหลาบ จากการทดลองใช้เชื้อ Bt ร่วมกับไวรัส SlNPV ที่อ. กำแพงแสน
จ.นครปฐม

กรรมวิธี (ต่อน้ำ 20 ลิตร)	จำนวนหนอน/10 ต้น		
	ก่อนพ่นสาร	หลังพ่นครั้งที่ 1	หลังพ่นครั้งที่ 2
1. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร	11.75	6.75[1/] ab	0.50 a
2. ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตร	12.00	7.50 b	0.75 a
3. เชื้อ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV 30 มิลลิลิตร	12.25	6.25 ab	0.25 a
4. เชื้อ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV 50 มิลลิลิตร	12.75	5.75 a	0.25 a
5. ไม่พ่นสาร	13.00	11.75 c	4.50 b
CV(%)	-	39.62	67.00

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 จำนวนดอกกุหลาบที่ได้คุณภาพและจำนวนดอกกุหลาบที่โดนหนอนเจาะทำลายในแปลงกุหลาบที่
อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

กรรมวิธี (ต่อน้ำ 20 ลิตร)	จำนวนทั้งหมด	ดอกดี	ดอกเสีย	% ดอกเสีย
1. เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร	981[1/]	948	33	3.36
2. ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตร	965	941	24	2.48
3. เชื้อ Bt 80 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV 30 มิลลิลิตร	1,060	1,021	39	3.68
4. เชื้อ Bt 40 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV 50 มิลลิลิตร	1,067	1,028	39	3.37
5. ไม่พ่นสาร	1,055	1,001	54	5.12

[1/] จำนวนดอกกุหลาบทั้งหมดที่ทำการเก็บทุก 7 วัน เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ตั้งแต่วันที่ 5 มิ.ย. 55- 6 ก.ค. 55

กิจกรรมที่ย่อย 2.2. การผลิตและการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช
การทดลองที่ 2.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ
ผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆนี้ พบว่าการเพาะขยายเชื้อที่แนะนำให้ใช้กันในกลุ่มของเกษตรกรนั้น ส่วนใหญ่ให้ผลผลิตของเชื้อค่อนข้างต่ำ โดยเชื้อแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน ที่ใช้ในการทดลอง มีจำนวนโคโลนีสูงสุดเฉลี่ยเท่ากับ 1.8×10^{10} CFU/ml และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย บีที มาเพาะขยายด้วยอาหารชนิดต่างๆ พบว่า ได้จำนวนโคโลนีน้อยลงทุกชนิด โดยพบว่าเมื่อเพาะขยายเชื้อด้วย ข้าวฟ่าง, ชานอ้อยผสมรำ และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ย

เท่ากับ $2.9x10^8$, $1.9xx10^8$ และ $1.7x10^8$ CFU/ml ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ข้าวสุก นมข้นหวาน หางนม และน้ำมะพร้าว มีจำนวนโคโลนีเฉลี่ยเท่ากับ $8.8x10^7$, $3.2x10^7$, $7.4x10^6$ และ $4.5x10^6$ CFU/ml ตามลำดับ ส่วนน้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่และเชื้อพลายแก้ว ไม่สามารถตรวจนับโคโลนีได้เนื่องจากมีการปนเปื้อนค่อนข้างสูง

เมื่อนำไปตรวจนับจำนวนสปอร์พบว่า เชื้อที่ได้จากการเพาะขยายด้วยอาหารชนิดต่างๆมีจำนวนสปอร์ค่อนข้างต่ำกว่ามาตรฐานอย่างชัดเจน โดยเชื้อแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย $5.1x10^9$ CFU/ml รองลงมา คือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ข้าวสุก ข้าวฟ่าง น้ำมะพร้าว ชานอ้อยผสมรำ นมข้นหวาน หางนม และน้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่ มีจำนวนสปอร์เฉลี่ย $8.4x10^7$, $2.4x10^7$, $1.8x10^7$, $1.2x10^7$, $1.1x10^7$, $6.5x10^6$, $4.0x10^6$ และ $3.3x10^5$ CFU/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่มักด้วยอาหารชนิดต่างๆ

กรรรมวิธี	Total cell count (CFU/ml)	Spore count (CFU/ml)
1. น้ำมะพร้าว+ไข่ไก่+เชื้อพลายแก้ว	Con.	$3.3x10^5$
2. น้ำมะพร้าว	$4.5x10^6$	$1.2x10^7$
3. นมข้นหวาน	$3.2x10^7$	$6.5x10^6$
4.หางนม	$7.4x10^6$	$4.0x10^6$
5.ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	$1.7x10^8$	$8.4x10^7$
6.ข้าวฟ่าง	$2.9x10^8$	$1.8x10^7$
7.ชานอ้อย + รำ	$1.9xx10^8$	$1.1x10^7$
8.ข้าวสุก	$8.8x10^7$	$2.4x10^7$
9.ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย บีที (เดลฟิน^R)	$1.8x10^{10}$	$5.1x10^9$

Con. = Contaminate

เมื่อนำผลผลิตจากการเพาะขยายเชื้อไปทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย บีที กับหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่า ทุกกรรมวิธีมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน โดยแบคทีเรีย บีที มาตรฐาน ที่มีจำนวนหนอนตายสูงที่สุดเฉลี่ย 30 ตัวต่อกรรมวิธี เมื่อครบ 7 วัน และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่เหลือที่มีจำนวนหนอนตายค่อนข้างต่ำอย่างชัดเจน โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เพาะขยายจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีจำนวนหนอนกระทู้ผักตายรองลงมาเฉลี่ย 11.0 ตัว ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับเชื้อแบคทีเรียที่เพาะขยายจากน้ำมะพร้าว, น้ำมะพร้าวผสมไข่ไก่, ข้าวสุก และ ชานอ้อยผสมรำ ที่พบจำนวนหนอนตายเฉลี่ย 6.7, 5.0, 4.0, และ 2.0 ตัวต่อกรรมวิธีตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่เพาะขยายจาก นมข้นหวาน, หางนม และ ข้าวฟ่าง มีจำนวนหนอนตายเฉลี่ย 1.0 ตัวเท่ากันหมดและไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่พบหนอนตาย (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนและเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัย 2 จากแบคทีเรีย บีที ที่ผลิตโดยวิธีต่างๆ

กรรมวิธี	อัตรา (มล./น้ำ 20 ลิตร)	จำนวนหนอนตายเฉลี่ย 1/ (ตัว)	เปอร์เซ็นต์หนอนตาย (%)
1. น้ำมะพร้าว+ไข่ไก่+เชื้อพลายแก้ว	200	5.0 c	16.7
2. น้ำมะพร้าว	200	6.7 bc	2.0
3. นมข้นหวาน	200	1.0 d	3.3
4. หางนม	100	1.0 d	3.3
5. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์	200	11.0 b	36.7
6. ข้าวฟ่าง	150	1.0 d	3.3
7. ชานอ้อย + รำ	200	2.0 cd	6.7
8. ข้าวสุก	200	4.0 c	13.3
9. ชีวภัณฑ์แบคทีเรีย บีที (เดลฟิน^{R})	80	30.0 a	100.0
10. น้ำกลั่น	-	0 d	0
C.V. (100 %)	-	32.52	-

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองเห็นได้ว่าการเพาะขยายเชื้อแบคทีเรีย บีที ที่เกษตรกรปฏิบัติกัน ได้ผลผลิตของเชื้อที่ค่อนข้างต่ำ เมื่อพิจารณาจากจำนวนโคโลนีและสปอร์หลังการหมักนาน 48 ชม. พบว่าจำนวนโคโลนีและสปอร์จากการหมักด้วยสูตรอาหารต่างๆแตกต่างจากเชื้อมาตรฐานถึง 100 เท่า (ตารางที่ 1) และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ พบว่าการเพาะขยายเชื้อด้วยอาหารชนิดต่างๆมีประสิทธิภาพต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ทุกกรรมวิธี (ตารางที่ 2) นอกจากนี้การดำเนินการเพาะขยายเชื้อในการทดลองนี้ ได้ปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการที่ค่อนข้างปลอดเชื้อ แต่สำหรับเกษตรกรทั่วไปอาจไม่สามารถดำเนินการเช่นนี้ได้ จึงมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนเชื้อชนิดอื่นค่อนข้างสูง

การทดลองที่ 2.2.2 การศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และไวรัส NPV

ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Bt และไวรัส NPV

จากการทดลองพบว่าเมื่อตรวจนับปริมาณเชื้อ Bta หลังจากผสมกับ**สารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ 0 ชั่วโมง** พบว่า มีสาร 1 ชนิด ที่เมื่อผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ carbendazim โดยมีปริมาณเชื้อที่ 0 ชั่วโมง เท่ากับ 8.45 x10^{6} cfu/ml และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ captan โดยมีปริมาณเชื้อที่ 0 ชั่วโมง 8.90 x10^{6}cfu/ml **ในชั่วโมงที่ 1** สารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ chlorothalonil โดยมีปริมาณเชื้อที่ 1 ชั่วโมง 1.37 x10^{7} cfu/ml และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ captan โดยมีปริมาณเชื้อที่ 1 ชั่วโมง 1.01 x10^{7} cfu/ml **ในชั่วโมงที่ 3** สารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ chlorothalonil, difenoconazole และ captan โดยมีปริมาณเชื้อที่ 3 ชั่วโมง 1.35 x10^{7}, 1.72 x10^{7} และ 1.93 x10^{7} cfu/ml ตามลำดับ และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้

เปรียบเทียบคือ captan โดยมีปริมาณเชื้อที่ 3 ชั่วโมง 1.11 x10^7 cfu/ml **ในชั่วโมงที่ 5** สารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ carbendazim, difenoconazole และcaptan โดยมีปริมาณเชื้อที่ 5 ชั่วโมง 1.79 x10^7, 1.72 x107 และ 1.35 x10^7 cfu/ml ตามลำดับ และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ carbendazim, chlorothalonil, difenoconazole และcaptan โดยมีปริมาณเชื้อที่ 5 ชั่วโมง 1.42 x10^7, 1.44 x10^7, 1.28 x10^7 และ 1.82 x10^7 cfu/ml ตามลำดับ (ตาราง 1) จากการตรวจนับปริมาณเชื้อ Bta หลังจากผสมกับ**สารป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชที่ 0 และ 1 ชั่วโมง** พบว่าไม่มีสารใดที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้วมีปริมาณน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบ **ในชั่วโมงที่ 3** สารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ amitraz โดยมีปริมาณเชื้อที่ 3 ชั่วโมง 1.12 x10^7 cfu/ml และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ pyridaben โดยมีปริมาณเชื้อที่ 3 ชั่วโมง 1.50 x10^7 cfu/ml **ในชั่วโมงที่ 5** สารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ pyridaben โดยมีปริมาณเชื้อที่ 5 ชั่วโมง 8.75 x10^5 cfu/ml และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ amitraz และ pyridaben โดยมีปริมาณเชื้อที่ 5 ชั่วโมง 1.86 x10^7 และ 1.29 x10^7 cfu/ml ตามลำดับ (ตาราง 2) จากการตรวจนับปริมาณเชื้อ Bta หลังจากผสมกับ**สารป้องกันกำจัดแมลงที่ 0 ชั่วโมง** พบว่า มีสารที่เมื่อผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ imidacloprid, fipronil และ thiamethoxam โดยมีปริมาณเชื้อที่ 0 ชั่วโมง 1.64 x10^7, 1.71 x10^7 และ 1.40 x10^7 cfu/ml ตามลำดับ และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ thiamethoxam โดยมีปริมาณเชื้อที่ 0 ชั่วโมง 1.90 x10^7 cfu/ml **ในชั่วโมงที่ 1** สารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ imidacloprid และ thiamethoxam โดยมีปริมาณเชื้อที่ 1 ชั่วโมง 1.21 x10^7 และ 1.57 x10^7cfu/ml ตามลำดับ และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ imidacloprid และ thiamethoxam โดยมีปริมาณเชื้อที่ 1 ชั่วโมง 1.11 x10^7และ 1.43 x10^7cfu/ml ตามลำดับ **ในชั่วโมงที่ 3** พบว่าสารที่ผสมกับเชื้อ Bta แล้วมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta ที่ใช้เปรียบเทียบคือ thiamethoxam โดยมีปริมาณเชื้อที่ 3 ชั่วโมง 5.20 x10^6 cfu/ml และสารที่ผสมกับเชื้อ Btk แล้ว มีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบคือ thiamethoxam โดยมีปริมาณเชื้อที่ 3 ชั่วโมง 1.03 x10^7 cfu/ml **ในชั่วโมงที่ 5** พบว่าไม่มีสารที่ผสมกับเชื้อ Bta และ Btk แล้วมีปริมาณเชื้อน้อยกว่าเชื้อ Bta และ Btk ที่ใช้เปรียบเทียบ (ตาราง 3)

ขั้นตอนที่ 2 ก. ศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย Bt

โดยทำการทดลองประสิทธิภาพของเชื้อ Bta ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ แล้วกับหนอนกระทู้หอม (ตาราง 4) จากการทดลองพบว่า **ในชั่วโมงที่ 0** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 68.57 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Bta+carbendazim, Bta+chlorothalonil และ Bta+difenoconazole ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 37.66, 59.74 และ 49.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีการใช้ Bta+captan, Bta+ amitraz, Bta+ pyridaben, Bta+ imidacloprid, Bta+ fipronil และ Bta+ thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 84.28, 98.64, 87.14, 70.27, 81.89 และ 88.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ในชั่วโมงที่ 1** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 60.87 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Bta+carbendazim, Bta+chlorothalonil, Bta+difenoconazole และ Bta+captan ทำให้หนอนตาย

ได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 44.77, 34.32, 38.80และ 56.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีการใช้ Bta+ amitraz, Bta+ pyridaben, Bta+ imidacloprid, Bta+ fipronil และ Bta+ thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 91.78, 75.36, 93.15, 93.15 และ 75.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ในชั่วโมงที่ 3** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 50.67 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Bta+chlorothalonil, Bta+difenoconazole และ Bta+thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 35.52, 25.00 และ 45.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีการใช้ Bta+ carbendazim, Bta+captan, Bta+ amitraz, Bta+ pyridaben, Bta+ imidacloprid และ Bta+ fipronil ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 69.73, 55.33, 86.09, 57.33, 77.41 และ 79.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ในชั่วโมงที่ 5** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 47.36 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Bta+carbendazim, Bta+chlorothalonil และ Bta+difenoconazole ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 45.31, 21.87และ 32.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Bta+captan, Bta+ amitraz, Bta+ pyridaben, Bta+ imidacloprid, Bta+ fipronil และ Bta+ thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Bta อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 69.73, 77.35, 57.31, 58.49, 88.67 และ 77.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการทดลองศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของเชื้อ Btk (ตาราง 5) พบว่า **ในชั่วโมงที่ 0** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 22.86 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Btk+ thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 20.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีการใช้ Btk+carbendazim, Btk+captan, Btk+chlorothalonil Btk+difenoconazole, Btk+amitraz, Btk+ pyridaben, Btk+ imidacloprid และ Btk+ fipronil ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 45.45, 32.46, 29.87, 24.28, 85.13, 38.57, 75.67 และ 81.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ในชั่วโมงที่ 1** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 18.84เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Btk+carbendazim และ Btk+chlorothalonil ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธี Btk+difenoconazole, Btk+captan, Btk+amitraz, Btk+pyridaben, Btk+imidacloprid, Btk+fipronil และ Btk+thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 23.88, 33.33, 85.36, 57.97, 87.67, 63.01 และ 27.54 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **ในชั่วโมงที่ 3** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 32.00 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Btk+chlorothalonil และ Btk+pyridaben ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 22.36 และ 24.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธี Btk+carbendazim, Btk+difenoconazole, Btk+captan, Btk+amitraz, Btk+imidacloprid, Btk+fipronil และ Btk+thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 36.84, 34.21, 33.33, 75.58, 61.29, 77.41 และ 52.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **และในชั่วโมงที่ 5** กรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียวสามารถฆ่าหนอนตายได้ 39.47 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีการใช้ Btk+carbendazim, Btk+chlorothalonil, Btk+difenoconazole, Btk+captan และ Btk+thiamethoxam ทำให้หนอนตายได้น้อยกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน

35.93, 1.56, 9.37, 18.42 และ 35.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธี Btk+amitraz, Btk+pyridaben, Btk+imidacloprid และ Btk+fipronil ทำให้หนอนตายได้มากกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Btk อย่างเดียว โดยมีการตายของหนอน 73.58, 57.89, 77.35 และ 79.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ข. ศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของไวรัส NPV

จากการทดลองประสิทธิภาพของไวรัส SeNPV ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ แล้วกับหนอนกระทู้หอม (ตาราง 6) จากการทดลองพบว่า กรรมวิธีการใช้ไวรัส SeNPV อย่างเดียวและในทุกกรรมวิธีที่ใช้ไวรัส SeNPV ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ สามารถทำให้หนอนตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน ยกเว้นกรรมวิธีที่ใช้ไวรัส SeNPV+captan และกรรมวิธีไวรัส SeNPV+ amitraz ที่ทำให้หนอนตาย 97.50 และ 97.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

และจากการทดลองประสิทธิภาพของไวรัส HaNPV ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆแล้วกับหนอนเจาะสมอฝ้าย (ตาราง 7) จากการทดลองพบว่า กรรมวิธีการใช้ไวรัส HaNPV อย่างเดียวและในทุกกรรมวิธีที่ใช้ไวรัส HaNPV ที่ได้ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ สามารถทำให้หนอนตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 7 วัน

ตาราง 1 ปริมาณของเชื้อ Bt หลังจากผสมกับสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่ทิ้งไว้ในชั่วโมงต่างๆ (cfu/ml)

กรรมวิธี	ชั่วโมงที่			
	0	1	3	5
Bta	1.02×10^7	1.40×10^7	2.29×10^7	1.82×10^7
Bta+carbendazim	8.45×10^6	4.54×10^7	8.8×10^7	1.79×10^7
Bta+chlorothalonil	1.22×10^7	1.37×10^7	1.35×10^7	6.33×10^7
Bta+difenoconazole	1.82×10^7	1.57×10^7	1.72×10^7	1.72×10^7
Bta+captan	1.03×10^7	1.99×10^7	1.93×10^7	1.35×10^7
Btk	2.23×10^7	1.28×10^7	1.53×10^7	2.01×10^7
Btk+carbendazim	3.16×10^7	2.30×10^7	3.38×10^7	1.42×10^7
Btk+chlorothalonil	1.27×10^7	1.94×10^7	1.81×10^7	1.44×10^7
Btk+difenoconazole	1.90×10^7	7.35×10^6	6.15×10^6	1.28×10^7
Btk+captan	8.90×10^6	1.01×10^7	1.11×10^7	1.82×10^7

ตาราง 2 ปริมาณของเชื้อ Bt หลังจากผสมกับสารป้องกันกำจัดไรศัตรูพืชที่ทิ้งไว้ในชั่วโมงต่างๆ (cfu/ml)

กรรมวิธี	ชั่วโมงที่			
	0	1	3	5
Bta	1.14×10^{7}	6.55×10^{6}	1.39×10^{7}	1.00×10^{7}
Bta+amitraz	1.91×10^{7}	2.53×10^{7}	1.12×10^{7}	1.54×10^{7}
Bta+pyridaben	2.53×10^{7}	1.48×10^{7}	1.81×10^{7}	8.75×10^{5}
Btk	2.64×10^{7}	2.35×10^{7}	1.79×10^{7}	2.76×10^{7}
Btk+ amitraz	3.54×10^{7}	1.85×10^{7}	5.78×10^{7}	1.86×10^{7}
Btk+ pyridaben	2.23×10^{7}	2.76×10^{7}	1.50×10^{7}	1.29×10^{7}

ตาราง 3 ปริมาณของเชื้อ Bt หลังจากผสมกับสารป้องกันกำจัดแมลงที่ทิ้งไว้ในชั่วโมงต่างๆ (cfu/ml)

กรรมวิธี	ชั่วโมงที่			
	0	1	3	5
Bta	2.02×10^{7}	1.99×10^{7}	1.53×10^{7}	1.12×10^{7}
Bta+imidacloprid	1.64×10^{7}	1.21×10^{7}	3.87×10^{7}	1.92×10^{7}
Bta+fipronil	1.71×10^{7}	3.28×10^{7}	3.29×10^{7}	2.44×10^{7}
Bta+thiamethoxam	1.40×10^{7}	1.57×10^{7}	5.20×10^{6}	1.06×10^{8}
Btk	3.47×10^{7}	1.52×10^{7}	1.45×10^{7}	1.55×10^{7}
Btk+ imidacloprid	4.00×10^{7}	1.11×10^{7}	1.45×10^{7}	3.44×10^{7}
Btk+ fipronil	3.85×10^{7}	5.75×10^{7}	2.10×10^{7}	8.60×10^{7}
Btk+ thiamethoxam	1.90×10^{7}	1.43×10^{7}	1.03×10^{7}	9.17×10^{7}

ตาราง 4 การตายของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* วัยที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* (Bta) ที่ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ทิ้งไว้ในชั่วโมงต่างๆ

กรรมวิธี	ชั่วโมงที่			
	0	1	3	5
Bta	68.57[1/]	60.87	50.67	47.36
Bta+carbendazim	37.66	44.77	69.73	45.31
Bta+chlorothalonil	59.74	34.32	35.52	21.87
Bta+difenoconazole	49.35	38.80	25.00	32.81
Bta+captan	84.28	56.52	53.33	69.73
Bta+amitraz	98.64	91.78	87.09	77.35
Bta+pyridaben	87.14	75.36	57.33	57.31
Bta+imidacloprid	70.27	93.15	77.41	58.49
Bta+fipronil	91.89	93.15	79.03	88.67
Bta+thiamethoxam	88.57	75.36	45.33	77.63
Control	3.75	16.25	5.00	5.00

[1/] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมจากการตรวจนับที่เวลา 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ

ตาราง 5 การตายของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* วัยที่ 2 หลังจากได้รับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) ที่ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ทิ้งไว้ในชั่วโมงต่างๆ

.

กรรมวิธี	ชั่วโมงที่			
	0	1	3	5
Btk	22.86[1/]	18.84	32.00	39.47
Btk+carbendazim	45.45	0	36.84	35.93
Btk+chlorothalonil	32.46	0	22.36	1.56
Btk+difenoconazole	29.87	23.88	34.21	9.37
Btk+captan	24.28	33.33	33.33	18.42
Btk+ amitraz	85.13	85.36	72.58	73.58
Btk+ pyridaben	38.57	57.97	24.00	57.89
Btk+ imidacloprid	75.67	87.67	61.29	77.35
Btk+ fipronil	81.08	63.01	77.41	79.24
Btk+ thiamethoxam	20.00	27.54	52.00	35.52
control	3.75	16.25	5.00	5.00

[1/] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมจากการตรวจนับที่เวลา 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ

ตาราง 6 การตายของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* วัยที่ 2 หลังจากได้รับไวรัส SeNPV ที่ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ

.

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายในวันที่			
	1	3	5	7
SeNPV	0	15.00	95.00	100
SeNPV +carbendazim	0	32.50	97.50	100
SeNPV +chlorothalonil	0	17.50	100	100
SeNPV +difenoconazole	7.50	15.00	100	100
SeNPV +captan	0	10.00	97.50	97.50
SeNPV + amitraz	2.50	17.50	97.50	97.50
SeNPV + pyridaben	2.50	12.50	97.50	100
SeNPV + imidacloprid	2.50	30.00	100	100
SeNPV + fipronil	7.50	30.00	97.50	100
SeNPV + thiamethoxam	0	17.50	100	100
control	0	2.50	7.50	20.00

ตาราง 7 การตายของหนอนกระทู้หอม *Helicoverpa armigera* วัยที่ 2 หลังจากได้รับไวรัส HaNPV ที่ผสมกับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชชนิดต่างๆ

.

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตายในวันที่			
	1	3	5	7
HaNPV	0	22.50	100	100
HaNPV +carbendazim	2.50	27.50	97.50	100
HaNPV +chlorothalonil	5.00	37.50	100	100
HaNPV +difenoconazole	2.50	20.00	100	100
HaNPV +captan	7.50	27.50	100	100
HaNPV + amitraz	0	32.50	97.50	100
HaNPV + pyridaben	0	17.50	100	100
HaNPV + imidacloprid	10.00	57.50	100	100
HaNPV + fipronil	2.50	40.00	100	100
HaNPV + thiamethoxam	0	40.00	100	100
control	0	2.50	7.50	7.50

การทดลองที่ 2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ไอโซเลทต่างๆ ในการควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืช

ผลการทดลอง

เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ *Bt* จำนวน 5 ไอโซเลท คือ DOA45026046, DOA45030011, DOA45096002, DOA45558017 และ DOA45647002 เพื่อใช้ในการฉีดพ่นตามกรรมวิธี ปลูกคะน้าที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี เมื่อต้นคะน้าอายุ 21 วัน ตรวจนับหนอนผีเสื้อศัตรูพืช พบการระบาดต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจ จึงติดต่อเกษตรกรที่ อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี และปลูกคะน้า เมื่อคะน้าอายุ 21 วัน ตรวจนับหนอนผีเสื้อศัตรูพืช พบหนอนใยผักระบาดสูงกว่าระดับเศรษฐกิจ จึงฉีดพ่นสารตามกรรมวิธีทั้ง 9 กรรมวิธี ทุก 5 วัน จำนวน 5 ครั้ง โดยตรวจนับจำนวนหนอนใยผักก่อนพ่นสารตามกรรมวิธีทุกครั้ง

จำนวนหนอนใยผักก่อนทำการฉีดพ่นเฉลี่ย 12.00-18.67 ตัว ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเริ่มฉีดพ่นตามกรรมวิธีครั้งที่ 1 จำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 3.00-7.33 ตัว แตกต่างทางสถิติกับแปลงควบคุมที่มีหนอนใยผักเฉลี่ย 9.67 ตัว ฉีดพ่นครั้งที่ 2 จำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 3.33-1.33 ตัว แตกต่างทางสถิติกับแปลงควบคุมที่มีหนอนใยผักเฉลี่ย 8.00 ตัว ฉีดพ่นครั้งที่ 3 จำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 4.67-2.67 ตัว แตกต่างทางสถิติกับแปลงควบคุมที่มีหนอนใยผักเฉลี่ย 9.00 ตัว ฉีดพ่นครั้งที่ 4 จำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 3.00-5.33 ตัว แตกต่างทางสถิติกับแปลงควบคุมที่มีหนอนใยผักเฉลี่ย 9.00 ตัว และเมื่อฉีดพ่นครั้งที่ 5 จำนวนหนอนใยผักเฉลี่ย 0.00-1.67 ตัว แตกต่างทางสถิติกับแปลงควบคุมที่มีหนอนใยผักเฉลี่ย 6.67 ตัว ในระหว่างทำการทดลองพบการระบาดของด้วงหมัดผัก และเพลี้ยอ่อน ทำให้คะน้าบางส่วนชะงักการเจริญเติบโต ใบหงิกงอ ทำให้ผลผลิตคะน้ามีน้ำหนักของน้อยกว่าปกติและใบมีรอยทำลายของหนอนใยผัก ซึ่งมีผลต่อราคาผลผลิต

จำนวนหนอนใยผักเมื่อฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bt* 5 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับ *Bt* subsp. aizawai, *Bt* subsp. kurstaki ซึ่งเป็นชนิดที่ผลิตและจำหน่ายเป็นการค้า และสารเคมี Tolfenpyred ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าการใช้เชื้อแบคทีเรียบีทีสามารถควบคุมหนอนใยผักได้เช่นเดียวกับการใช้สารเคมี แต่มีความปลอดภัยต่อเกษตรกร และสิ่งแวดล้อมมากกว่า เพราะมีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงกลุ่มเป้าหมาย และสามารถอนุรักษ์แมลงศัตรูธรรมชาติ เช่น ด้วงเต่าลายหยักด้วงเต่าสีส้ม ซึ่งพบในแปลงปลูกคะน้าที่ทำการทดสอบ

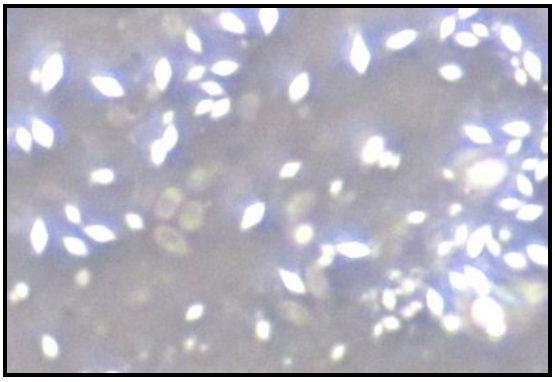


Figure 1 *Bacillus thuringiensis* crystal protein

Figure 2 Kale field

Figure 3 *Plutella xylostella*

Table 1 Comparison of number of *Plutella xylostella* observed before and 5 days after spraying in the Kale field

Treatment	Average number of *Plutella xylostella* in Kale plots (larvae/20 plants)					
	Before	After spraying				
		1st	2nd	3th	4th	5th
DOA 45026046	15.33	3.33a	1.33a	4.00a	5.33ab	0.67a
DOA 45030011	18.67	7.00ab	3.00a	4.67a	4.67a	0.00a
DOA 45096002	11.67	3.00a	3.00a	2.67a	3.67a	1.00a
DOA 45558017	18.33	3.67a	2.67a	4.00a	3.00a	1.67a
DOA 45647002	12.00	7.33ab	1.67a	4.00a	4.00a	1.67a
Bt subsp. *aizawai*	18.67	6.00ab	3.33a	4.00a	3.00a	1.00a
Bt subsp. *kurstaki*	14.00	6.67ab	3.00a	4.33a	4.33a	0.67a
Tolfenpyred	14.33	5.00ab	2.67a	3.67a	4.33a	1.67a
control	16.33	9.67b	8.00b	9.00b	9.00b	6.67b
CV%	17.60	38.28	60.36	39.71	39.55	117.36

1/In columns, mean followed by the common letters are not significantly different at the level of 95% by DMRT

Table 2 Average yield of kale grown in plots (Kg/m^2)

Treatment	Average yield (Kg/m^2)
DOA 45026046	1.7
DOA 45030011	1.63
DOA 45096002	1.77
DOA 45558017	1.63
DOA 45647002	1.83
Bt subsp. *aizawai*	1.67
Bt subsp. *kurstaki*	1.77
Tolfenpyred	1.70
control	1.53

การทดลองที่ 2.2.4 การศึกษาการพัฒนาความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของหนอนกระทู้หอม

ผลการทดลอง

ในช่วงปี 2555 เป็นช่วงที่ได้รับผลกระทบจากการเกิดอุทกภัย ทำให้หนอนทดลองที่ได้เลี้ยงไว้เกิดความเสียหายทั้งหมด และเมื่อได้ทำการออกเก็บรวบรวมหนอนกระทู้หอมจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ มาทำการเลี้ยงขยายพบว่า มีการระบาดของเชื้อโปรโตซัวทำให้หนอนอ่อนแอและติดเชื้อตายเป็นจำนวนมาก จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้การทดลองทำ strain selection ในช่วงแรกไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเก็บหนอนกระทู้หอมจากแหล่งปลูกพืชอื่นๆ เข้ามาเลี้ยงขยายใหม่เพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ทำการทดลองได้ในปีถัดไป (2556) จึงได้ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมในจังหวัดกาญจนบุรี มาทำการเลี้ยงขยายเพื่อใช้ในการทดลอง เมื่อเลี้ยงหนอนได้เพียงแค่ในรุ่น F1 พบว่า มีการระบาดของเชื้อโปรโตซัวทำให้หนอนอ่อนแอและติดเชื้อตายเป็นจำนวนมากไม่สามารถทำการเลี้ยงขยายได้เพียงพอต่อการทำการทดลอง ดังนั้นจึงได้ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมจากพื้นที่ปลูกหอมหัวใหญ่ที่มีการระบาดของหนอนในจังหวัดกาญจนบุรี เข้ามาเลี้ยงขยายใหม่เพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ทำการทดลองได้ จากผลการทดลองหาค่าความเป็นพิษของเชื้อ Bt โดยใช้ค่า LC_{50} ของหนอนกระทู้หอมที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ มี 3 กลุ่ม คือ 1.หนอนกระทู้หอมที่ได้รับการคัดเลือกด้วยเชื้อ Bta 2.หนอนกระทู้หอมที่ได้รับการคัดเลือกด้วยเชื้อ Btk และ 3.หนอนกระทู้หอมที่ไม่ได้รับการคัดเลือก จากการทดลองพบว่า

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*

ในกลุ่มประชากรหนอนกระทู้หอมที่ไม่ได้รับการคัดเลือก (unselected colony) มีค่า LC50 ในหนอนรุ่น F2, F3 และ F4 เท่ากับ 5,245,332.93, 18,720,646.33 และ 4,094,022.95 cfu/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 1) และในกลุ่มประชากรหนอนกระทู้หอมที่ได้รับการคัดเลือก (Bta selected colony) มีค่า LC50 ในหนอนรุ่น F2, F3, และ F4 เท่ากับ 7,971,529.47, 24,474,004.27 และ 6,148,904.74 cfu/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และมีค่า RR เท่ากับ 1.51, 1.30 และ 0.77 เท่า ในรุ่น F2, F3, และ F4 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*

ในกลุ่มประชากรหนอนกระทู้หอมที่ไม่ได้รับการคัดเลือก (unselected colony) มีค่า LC50 ในหนอนรุ่น F2, F3 และ F4 เท่ากับ 48,326,042.81, 7,100,571.58 และ3,922,951.06cfu/ml ตามลำดับ(ตารางที่ 3) และ

ในกลุ่มประชากรหนอนกระทู้หอมที่ได้รับการคัดเลือก (Btk selected colony) มีค่า LC50 ในหนอนรุ่น F2, F3, และ F4 เท่ากับ 832,256.37, 16,138,770.70 และ 5,080,182.13 cfu/ml ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และมีค่า RR เท่ากับ 0.08, 2.27 และ 1.29 เท่า ในรุ่น F2, F3, และ F4 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงประชากรหนอนกระทู้หอมที่เป็น Bt selected colony จนถึงรุ่น F4 เมื่อหนอนเจริญเป็นผีเสื้อ ผีเสื้อที่ได้เกือบทั้งหมดมีลักษณะพิการผิดปกติ ไม่สามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ ในส่วนผีเสื้อที่ปกติที่สามารถวางไข่ได้ พบว่าไข่ที่ได้ส่วนใหญ่จะฝ่อ ไม่ฟักเป็นตัวหนอน ทำให้ได้ปริมาณหนอนทดลองไม่เพียงพอที่จะทำการทดลองต่อไปได้ในรุ่น F5 และเมื่อได้รับการคัดเลือกด้วยเชื้อ Bt จนถึงรุ่น F6 ประชากรหนอนได้ตายทั้งหมดไม่สามารถเลี้ยงขยายต่อไปได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองได้ถึงรุ่น F4 เท่านั้น

การตรวจสอบความต้านทานนี้จะใช้หลักของ เทวินท์และคณะ (2545) โดยใช้ค่า RR ที่มากกว่าหรือเท่ากับ 10 เท่า ของสายพันธุ์อ่อนแอจะเป็นสายพันธุ์ต้านทาน (resistant strain) และค่า RR ที่น้อยกว่า 10 เท่า จะเป็นสายพันธุ์ทนทาน (tolerant strain) จากการตรวจสอบพบว่า ในหนอนกระทู้หอมที่ทำการทดลองทุกรุ่นอยู่ในระดับที่ทนทาน ไม่อยู่ในระดับที่มีการต้านทาน

ตารางที่ 1 ค่า LC_{50} ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* ของหนอนกระทู้หอมที่เป็น unselected colony

Spodoptera exigua (F)	LC_{50} (cfu/ml)	95% confidence limit of LC_{50}	
		Lower	Upper
F2	5,245,332.93	3,703,942.37	7,838,377.07
F3	18,720,646.33	-	-
F4	4,094,022.95	-	-

ตารางที่ 2 ค่า LC_{50} ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* ของหนอนกระทู้หอมที่เป็น Bta selected colony

หนอนกระทู้หอม (F)	LC_{50} (cfu/ml)	95% confidence limit of LC_{50}	
		Lower	Upper
F2	7,971,529.47	5,611,064.01	13,224,823.40
F3	24,474,004.27	-	-
F4	6,148,904.74	-	-

ตารางที่ 3 ค่า LC_{50} ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* ของหนอนกระทู้หอมที่เป็น unselected colony

หนอนกระทู้หอม (F)	LC_{50} (cfu/ml)	95% confidence limit of LC_{50}	
		Lower	Upper
F2	48,326,042.81	-	-
F3	7,100,571.58	3,626,183.22	32,134,876.92
F4	3,922,951.06	-	-

ตารางที่ 4 ค่า LC_{50} ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* ของหนอนกระทู้หอมที่เป็น Btk selected colony

หนอนกระทู้หอม (F)	LC_{50} (cfu/ml)	95% confidence limit of LC_{50}	
		Lower	Upper
F2	832,256.37	428,993.71	5,535,986.82
F3	16,138,770.70	12,335,844.03	24,009,091.30
F4	5,080,182.13	-	-

ตารางที่ 5 อัตราความต้านทานเชื้อ Bt ของหนอนกระทู้หอมในรุ่นต่างๆ ที่เป็น selected colony

หนอนกระทู้หอม	*B. thuringiensis* subsp. *aizawai*		*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*	
(F)	LC_{50} (cfu/ml)	RR[1/]	LC_{50} (cfu/ml)	RR[2/]
F2	7,971,529.47	1.51	832,256.37	0.08
F3	24,474,004.27	1.30	16,138,770.70	2.27
F4	6,148,904.74	0.77	5,080,182.13	1.29

[1/, 2/] RR = Resistance Ratio = LC_{50} selected colony / LC_{50} unselected colony

กิจกรรมที่ย่อย 2.3. การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.3.1 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรีย; *Beauveria bassiana* (Balsamo) เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

ผลการดำเนินการ

การคัดเลือกเชื้อราบิวเวอเรีย เริ่มต้นในเดือนตุลาคม 2553 ซึ่งในขณะนั้นได้เก็บตัวอย่างแมลงเป็นโรคในธรรมชาติ จำนวน 12 ตัวอย่าง ได้แก่ เชื้อราจากใบส้มโอ อ.บางขันแตก จังหวัดสมุทรสงคราม จำนวน 1 ตัวอย่าง, เชื้อราจากเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา จำนวน 1 ตัวอย่าง, เชื้อราจากหนอนแทะเปลือกลองกอง จ.จันทบุรี จำนวน 1 ตัวอย่าง และเชื้อราจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าวที่ จ.สุพรรณบุรี จำนวน 9 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และส่งจำแนกเชื้อที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งในขณะนั้นสามารถจำแนกเชื้อราแมลงบริสุทธิ์ได้ 3 ชนิด โดยยังไม่ได้ระบุสายพันธุ์คือ *Paecillomyces* sp., *Lecanicillium* sp. และ *Isaria* sp. เนื่องจากยังไม่สามารถหาเชื้อราบิวเวอเรียในธรรมชาติได้ ดังนั้นในปี 2555 จึงได้ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราบิวเวอเรียจากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร (B4) ซึ่งแยกเชื้อได้จากมอดเจาะเมล็ดกาแฟ เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงศัตรูพืชต่างๆ ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก, หนอนกระทู้หอม, เพลี้ยแป้งสีชมพู และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในขณะเดียวกันก็ได้ขอความอนุเคราะห์เชื้อราบิวเวอเรีย จากกรมส่งเสริมการเกษตร (B2) ซึ่งแยกเชื้อจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล รวมทั้งติดต่อขอซื้อเชื้อราบิวเวอเรียจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติจำนวน 2 ไอโซเลท (BCC22355 และ BCC31578) เพื่อนำเชื้อราจากทั้ง 2 แหล่งมาใช้ในการเปรียบเทียบการทดสอบประสิทธิภาพกับเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร (B4) ที่ได้รับงานทดสอบเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร (B4) เริ่มต้นในเดือนตุลาคม 2554 ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ แมลงศัตรูพืชที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ เพลี้ยแป้งสีชมพู เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม, โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจำนวน 3 ครั้งในเวลาที่ต่างกัน เพื่อยืนยันผลการทดลอง ซึ่งแสดงผลการทดสอบดังนี้

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียกับเพลี้ยแป้งสีชมพู

ผลการทดสอบประสิทธิภาพพบว่ามีความแตกต่างจากผลการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอม โดยพบว่าเชื้อราบิวเวอเรียทุกไอโซเลทสามารถทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ตั้งแต่ 60 – 100% จากผลการทดลองครั้งที่ 1 พบว่าไอโซเลท B4, BCC22355 และ BCC31578 ทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ 96, 97 และ 99% ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ส่วน B2 ทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อ 60% ผลการทดลองครั้งที่ 2 พบว่าทุกไอโซเลททำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ดีไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยพบว่า ไอโซเลท B2, BCC31578, B4, BCC22355 ทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อ 92, 98, 99 และ 100% ตามลำดับ และในการทดลองครั้งที่ 3 ยังคงพบว่าทุกไอโซเลททำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ดีไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยพบว่าไอโซเลท B4, BCC22355 และ BCC31578 ทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ 100% ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ส่วน B2 ทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ 98% (ตารางที่ 1)

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

พบว่าเชื้อราบิวเวอเรียทุกไอโซเลทที่นำมาใช้ทดสอบมีประสิทธิภาพต่ำในการทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อ จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อทั้ง 3 ครั้ง พบว่ามีการติดเชื้อราไม่เกิน 25% โดยผลจากการทดลองครั้งที่ 1 พบว่า เชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลท B2 ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อ 23.75%

ส่วนไอโซเลท BCC22355, BCC31578 และ B4 ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อ 7.5, 10 และ 12.5% ตามลำดับ ผลการทดลองครั้งที่ 2 พบว่าทุกไอโซเลทให้ผลไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยไอโซเลท B2, BCC31578, BCC22355 และ B4 ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อที่ 5, 5, 1.25 และ 3.75% ตามลำดับ และในการทดลองครั้งที่ 3 พบว่า ไอโซเลท BCC31578 ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อ 18.75% ในขณะที่ไอโซเลท B2, B4 และ BCC22355 ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลติดเชื้อที่ 2.5, 5 และ 7.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียกับหนอนกระทู้ผัก

พบว่าเชื้อราบิวเวอเรียทุกไอโซเลทที่นำมาใช้ทดสอบไม่มีประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้ผักติดเชื้อ จากการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อจำนวน 3 ครั้ง พบว่ามีการติดเชื้อราไม่ถึง 5% ในทุกไอโซเลทที่ทำการทดสอบ โดยการทดลองครั้งที่ 1 พบว่า เชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลท BCC31578 ของศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ ทำให้หนอนกระทู้ผักติดเชื้อเฉลี่ย 4% ในขณะที่เชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลท B4, BCC22355 และ B2 พบทำให้หนอนกระทู้ผักติดเชื้อ 2, 1 และ 0% ผลการทดลองครั้งที่ 2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การติดเชื้อราบิวเวอเรียให้ผลไม่แตกต่างจากครั้งแรก โดยพบไอโซเลท B2 ให้หนอนกระทู้ผักติดเชื้อ 2% ส่วนไอโซเลทอื่นๆที่เหลือไม่พบการติดเชื้อ และผลการทดลองครั้งที่ 3 ก็ให้ผลไม่แตกต่างจากใน 2 ครั้งแรกคือพบว่าไอโซเลท BCC31578 มีการติดเชื้อราเพียง 1% และไม่แตกต่างจากเชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลทอื่นๆที่เหลือ (ตารางที่ 3)

การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียกับหนอนกระทู้หอม

พบว่าให้ผลทดสอบใกล้เคียงและเป็นไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียกับหนอนกระทู้ผัก โดยพบว่าผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อทั้ง 3 ครั้ง มีการติดเชื้อราสูงสุดเพียง 6% ผลการทดลองครั้งที่ 1 พบว่าไอโซเลท B4 ทำให้หนอนกระทู้หอมติดเชื้อ 2% ในขณะที่ไอโซเลทอื่นๆที่เหลือไม่พบการติดเชื้อ การทดลองครั้งที่ 2 พบการติดเชื้อที่ 5, 3, 2 และ 0% ของโอโซเลท BCC31578, BCC22355, B4 และ B2 ตามลำดับ และในการทดลองครั้งที่ 3 พบการติดเชื้อที่ 6, 2, 2 และ 0% ของโอโซเลท BCC31578, BCC22355, B4 และ B2 ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร (B4) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์กรมส่งเสริมการเกษตร (B2) และสายพันธุ์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ (BCC22355 และ BCC31578) พบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท ให้ผลการทดสอบเป็นไปในทิศทางเดียวกันคือมีประสิทธิภาพดีเมื่อใช้ควบคุมเพลี้ยแป้งสีชมพู มากกว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า เชื้อทั้ง 4 ไอโซเลท อาจมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันในลำดับพันธุกรรม ทำให้มีความเฉพาะเจาะจงต่อเหยื่ออาศัยเป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งในอนาคตน่าจะได้มีการพิสูจน์โดยอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เพื่อความชัดเจนในสายพันธุกรรมต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลทต่างๆ กับเพลี้ยแป้งสีชมพู หลังทำการทดสอบ 7 วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อที่ $1X10^8$ โคนิเดีย/มล.

ไอโซเลทเชื้อราบิวเวอเรีย	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรีย[1/]ของเพลี้ยแป้งสีชมพู		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
B2 (DOAE)	60[1/] b	92 a	98 a
B4 (DOA/ชุมพร)	96 a	99 a	100 a
BCC22355 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	97 a	100 a	100 a
BCC31578 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	99 a	98 a	100 a
Control	0 c	0 b	0 b
CV	12.4%	7.2%	2.5%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลทต่างๆ กับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หลังทำการทดสอบ 9 วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อที่ 1X10^{8} โคนิเดีย/มล.

ไอโซเลทเชื้อราบิวเวอเรีย	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรีย[1/]ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
B2 (DOAE)	23.75[1/] a	5 a	2.5 bc
B4 (DOA/ชุมพร)	12.5 ab	3.75 a	5 bc
BCC22355 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	7.5 b	1.25 a	7.5 b
BCC31578 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	10 ab	5 a	18.75 a
Control	0 b	0 a	0 c
CV	85.6%	145.9%	49.7%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลทต่างๆกับหนอนกระทู้ผัก หลังทำการทดสอบ 10 วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อที่ 1X10^{8} โคนิเดีย/มล.

ไอโซเลทเชื้อราบิวเวอเรีย	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรีย[1/]ของหนอนกระทู้ผัก[2/]		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
B2 (DOAE)	0[1/] b	0 b	0 a
B4 (DOA/ชุมพร)	2 ab	2 a	0 a
BCC22355 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	1 ab	0 b	0 a
BCC31578 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	4 a	0 b	1 a
Control	0 b	0 b	0 a
CV	175%	306.2%	500%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว)

[2/] หนอนกระทู้ผักใช้หนอนวัย 2

ตารางที่ 4 แสดงค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรียไอโซเลทต่างๆกับหนอนกระทู้หอม หลังทำการทดสอบ 10 วัน โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อที่ 1X10^8 โคนิเดีย/มล.

ไอโซเลทเชื้อราบิวเวอเรีย	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราบิวเวอเรีย[1/]ของหนอนกระทู้หอม[2/]		
	การทดลองครั้งที่ 1	การทดลองครั้งที่ 2	การทดลองครั้งที่ 3
B2 (DOAE)	0[1/] b	0 a	0 b
B4 (DOA/ชุมพร)	2 a	2 a	2 b
BCC22355 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	0 b	3 a	2 b
BCC31578 (ศูนย์พันธุวิศวกรรมฯ)	0 b	5 a	6 a
Control	0 b	0 a	0 b
CV	306.2%	226.4%	127.5%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว)

[2/] หนอนกระทู้หอมใช้หนอนวัย 3

การทดลองที่ 2.3.2: การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร

ผลการดำเนินการ

จากการศึกษาหาเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม โดยใช้เมล็ดธัญพืช 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพดบดหยาบ ข้าวฟ่าง ข้าวเปลือก และปลายข้าว พบว่า เชื้อบิวเวอเรียสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดีย ได้มากที่สุดบนข้าวโพดบดหยาบ โดยจะให้โคนิเดีย 18.35 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 9.46 X 10^8 cfu/มล. รองลงมาคือ ข้าวฟ่าง ให้จำนวนโคนิเดีย 12.04 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 8.15 X 10^8 cfu/มล. ส่วนข้าวเปลือก และปลายข้าว พบว่าให้จำนวนโคนิเดีย และมีเปอร์เซ็นต์การงอกไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยข้าวเปลือกให้จำนวนโคนิเดีย 8.48 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 5.84 X 10^8 cfu/มล. ส่วนปลายข้าว พบว่าให้จำนวนโคนิเดีย 8.67 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 5.77 X 10^8 cfu/มล. (Table 1) ผลการเลี้ยงเชื้อราบิวเวอเรียด้วยเมล็ดธัญพืชพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมบนเมล็ดธัญพืชต่างๆ พบว่า เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีบนข้าวโพดบดหยาบ ส่วนข้าวฟ่าง ข้าวเปลือก และปลายข้าว เชื้อราเขียวมีการเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาหาความชื้นที่เหมาะสมของข้าวโพดบดหยาบที่ใช้เลี้ยงเชื้อบิวเวอเรีย โดยการใช้สัดส่วนของข้าวโพดบดหยาบ (50 กรัม/ถุง) ต่อปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. พบว่าอาหารที่เตรียมมีความชื้นในอาหารอยู่ที่ 25, 43, 54, 61 และ 66% ตามลำดับ อัตราส่วนที่เหมาะสมในการสร้างโคนิเดียอยู่ที่ข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อปริมาณน้ำ 50 มล. หรือ 1: 1 และข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อ

ปริมาณน้ำ 70 มล. โดยจะให้เปอร์เซ็นต์ความชื้นประมาณ 54% และ 61% ตามลำดับ ซึ่งทำให้เชื้อราสร้างโคนิเดียได้ 28.55 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และ 28.15 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 11.37 X 10^8 cfu/มล. และ 11.21 X 10^8 cfu/มล. ตามลำดับ การเพิ่มอัตราส่วนน้ำที่มากเกินไปคือ 90 มล. หรือน้อยเกินไป คือ 30 และ 10 มล. มีผลให้จำนวนโคนิเดีย และเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อราบิวเวอเรียลดลง (Table 2) ผลการทดลองสอดคล้องกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมโดยใช้ปริมาณน้ำที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 10, 30, 50, 70 และ 90 มล. และพบว่า อาหารที่เตรียมมีความชื้นประมาณ 25, 43, 54, 62 และ 69% ตามลำดับ และเชื้อราเขียวเจริญได้ดี เมื่อใส่อัตราน้ำที่ 50 - 90 โดยความชื้นในช่วงดังกล่าวให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยการทดลองครั้งนั้นเลือกใช้น้ำที่ปริมาตร 50 มล. ซึ่งวัดความชื้นได้ 54% แทนปริมาณน้ำที่ 70 และ 90 มล. เนื่องจากคำนึงถึงต้นทุนการผลิต การประหยัดน้ำและประหยัดพลังงานในการทำเป็นผงแห้ง นอกจากนี้ ยังคำนึงถึงการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ การเลี้ยงเชื้อราที่ความชื้นสูงเกินไปมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียได้มากกว่า ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับกับงานวิจัยของมลิวัลย์ และสุรพล (2525) ซึ่งมีการใช้เมล็ดธัญพืช และน้ำในอัตราส่วนต่างๆกัน คือ 40: 40, 40:50, 40:60 และ 40:70 ผลการทดลองสรุปว่าการใช้อัตราส่วน 40: 40 มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของราเขียวมากที่สุด นอกจากนี้ยังคล้ายกับงานวิจัยของทรงศักดิ์ (2543) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* บนกากมันสำปะหลังที่ระดับความชื้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80% โดยน้ำหนัก และผลการทดลอง สรุปว่าตัวอย่างที่มีความชื้น 50% ทำให้มีการเจริญเติบโตของเชื้อราดีที่สุด

การศึกษาปริมาณโมลาสที่เหมาะสม มีการศึกษาที่ความเข้มข้นโมลาสที่ 2, 4, 6, 8 และ 10% และไม่ใส่โมลาส พบว่าการไม่ใส่โมลาส เชื้อสามารถสร้างโคนิเดียได้ดีที่ 14.58 X 10^8 โคนิเดีย/มล. และมีการงอกของโคนิเดียเชื้อที่ 8.27 X 10^8 cfu/มล. จาก Table 3 แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณโมลาสมีผลทำให้จำนวนโคนิเดีย และเปอร์เซ็นต์การงอกของเชื้อลดลง แสดงว่าการใช้โมลาสไม่สามารถกระตุ้นการสร้างโคนิเดียของเชื้อราบิวเวอเรียให้เพิ่มขึ้นได้ ซึ่งผลการทดลองมีความแตกต่างจาก เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมโดยใช้โมลาสเป็นตัวแทนของคาร์โบไฮเดรตเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างโคนิเดีย โดยใช้ในอัตราความเข้มข้น ต่างกัน 6 ระดับ ตั้งแต่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10% ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้นของโมลาส ที่ 4% สามารถกระตุ้นให้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมสร้างโคนิเดียได้สูงสุด การใส่โมลาสที่ความเข้มข้นมากเกินไป จะทำให้ปริมาณการสร้างโคนิเดียลดลง

การศึกษาปริมาณยูเรียที่เหมาะสม มีการทดสอบยูเรียที่ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2 และไม่ใส่ยูเรีย พบว่า การใส่ยูเรียในปริมาณน้อยคือที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1% และการไม่ใส่ยูเรียทำให้เชื้อราบิวเวอเรียสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ใกล้เคียงกันที่ 32.27 X 10^8, 31.83 X 10^8 และ 34.07 X 10^8 โคนิเดีย/มล. ตามลำดับ และมีการงอกของโคนิเดียที่ 9.94 X 10^8, 9.63 X 10^8 และ 10.14 X 10^8 cfu/มล. ตามลำดับ (Table 4) ผลการทดลองสอดคล้องกับ เสาวนิตย์ และคณะ (2548) ที่ทดสอบการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมโดยใช้ปริมาณยูเรียในอัตราเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทำการทดสอบ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้ยูเรียในอัตราเข้มข้นตั้งแต่ 0, 1, 2, 3, 4, และ 5% ตามลำดับ และครั้งที่ 2 ใช้ยูเรียในอัตราเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ตามลำดับ ผลการทดลองครั้งที่ 1 พบว่าเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมสามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีในการใส่ยูเรียในช่วง 0 - 1% และผลการทดลองครั้งที่ 2 พบว่าการไม่ใส่ยูเรีย หรือการเติมยูเรียเพียง 0.5% ให้ปริมาณโคนิเดียที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งการทดลองครั้งนั้นสรุปว่าเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมมีความต้องการยูเรียในปริมาณที่น้อยมาก หรืออาจจะไม่จำเป็นเลยในการเจริญเติบโต การเติมยูเรียมากเกินไป ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของทรงศักดิ์ (2543) ที่ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus*

oligosporus บนกากมันสำปะหลัง พบว่า หากเติมยูเรียสูงกว่า 2.5% จะมีผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อราลดลงอย่างเห็นได้ชัด

การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร โดยอาศัยพื้นฐานของวิธีการเลี้ยงเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม *M. anisopliae* ในปี 2548 โดยมีการคัดเลือกเมล็ดธัญพืชที่เหมาะสม การศึกษาความชื้นในอาหาร แหล่งคาร์โบไฮเดรต และไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าผลที่ได้มีความใกล้เคียงกัน โดยเชื้อราบิวเวอเรียเลี้ยงได้ดีบนข้าวโพดบดหยาบ และใช้น้ำในอัตราส่วน 1: 1 เหมือนกัน แต่ต่างกันในเรื่องของการใช้โมลาส และยูเรีย

Table 1 Number of conidia and viable population of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on 4 different grains at room temperature for 7 days.

Grains	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)		Viable population (cfu/ml.)	
ground corn	18.35×10^8	a[2/]	9.46×10^8	a
sorghum	12.04×10^8	b	8.15×10^8	b
paddy	8.48×10^8	c	5.84×10^8	c
ground rice	8.67×10^8	c	5.77×10^8	c
CV (%)	26.3		5.0	

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 2 Number of conidia produced by *Beauveria bassiana* (Balsamo) at different percent moisture content of ground corn at the rate 50 gram reared on 5 diferrent volume of water.

water (ml.)	% Moisture content (MC)	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)		Viable population (cfu/ml.)	
10	25	7.66×10^8	d[2/]	6.81×10^8	c
30	43	22.22×10^8	b	10.48×10^8	ab
50	54	28.55×10^8	a	11.37×10^8	a
70	61	28.15×10^8	a	11.21×10^8	a
90	66	16.17×10^8	c	9.68×10^8	b
CV (%)	-	28.4		11.2	

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 3 Number of conidia and viable population of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on ground corn at 54%MC and 6 different volume of molasses.

% Molasses	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)		Viable population (cfu/ml.)	
0	14.58×10^8	a[2/]	8.27×10^8	a
2	13.44×10^8	ab	7.12×10^8	ab
4	11.68×10^8	abc	6.47×10^8	bc
6	12.46×10^8	abc	7.14×10^8	ab
8	9.05×10^8	bc	5.16×10^8	cd
10	7.59×10^8	c	4.03×10^8	d
CV (%)	47.0		23.4	

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 4 Number of conidia and viable population of *Beauveria bassiana* (Balsamo) on ground corn at 54%MC and 5 different level of urea.

% Urea	No. of conidia[1/] (conidia /ml.)		Viable population (cfu/ml.)	
0	34.07×10^8	a[2/]	10.14×10^8	a
0.5	32.27×10^8	a	9.94×10^8	a
1	31.83×10^8	a	9.63×10^8	ab
1.5	20.84×10^8	b	9.03×10^8	b
2	1.15×10^8	c	0.02×10^8	c
CV (%)	36.8		10.0	

[1/] Average of 10 replications.

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

การทดลองที่ 2.3.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม; *Metarhizium anisopliae*(Metsch) Sorokin เพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก; *Phyllotreta sinuata* Stephens)

ผลการดำเนินการ

การดำเนินงานในปี 2555

ผลการทดสอบประสิทธิภาพราเขียวเมตาไรเซียมทั้ง 10 ไอโซเลทได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 และM9 กับด้วงหมัดผักในห้องปฏิบัติการ พบว่าราเขียวเมตาไรเซียมที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั้ง 10 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการทำให้ด้วงหมัดผักติดเชื้อ โดยพบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3, M5, M7, M8, M2, M9, M1, M0 และ M6 มีประสิทธิภาพทำให้ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวได้ดีไม่แตกต่างกันในทางสถิติ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย 100, 100, 100, 97.50, 95, 91.25, 90, 88.75 และ 85% ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท M4 ทำให้ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวน้อยที่สุดที่ 73.75% (ตารางที่ 1)

จากผลการทดลองพบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3, M5 และ M7 มีความน่าสนใจในการใช้ควบคุมด้วงหมัดผักเนื่องจากให้ผลการทดสอบ 100% ในห้องปฏิบัติการ การทดลองในปีงบประมาณ 2556 ได้เลือกราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 ไปขยายผลทดสอบต่อในสภาพไร่เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้นในการทำให้ด้วงหมัดผักติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การดำเนินงานในปี 2556

ในช่วงแรกของการปลูกทั้ง 2 พื้นที่ เมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวเกิดการงอกไม่พร้อมกันต้องมีการปลูกซ่อมทำให้ต้นผักกาดหัวโตไม่สม่ำเสมอกันในบางแปลง และการทดลองที่ศวพ.สุพรรณบุรี พบการระบาดของด้วงหมัดผักมากกว่าที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี ผลการทดลองที่ศวพ.สุพรรณบุรี พบว่าด้วงหมัดผักมีประชากรเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ในทุกกรรมวิธีที่ใช้ และเมื่อพิจารณาในแต่ละสัปดาห์พบว่าจำนวนด้วงหมัดผักหลังปลูกไม่มีความแตกต่างกันในทุกกรรมวิธีที่ใช้ โดยในสัปดาห์ที่ 8 พบปริมาณด้วงหมัดผักในกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม อัตรา 100, 200 และ 300 กรัม ที่ 57.25, 42.75 และ 40.75 ตัว/แปลงย่อย ในกรรมวิธีที่ใช้ fipronil 5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร พบปริมาณด้วงหมัดผัก 52.50 ตัว/แปลงย่อย ส่วนแปลงควบคุมพบปริมาณด้วงหมัดผัก 57.75 ตัว/แปลงย่อย (ตารางที่ 2)

ผลการทดลองที่แปลงเกษตรกร อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี ให้ผลใกล้เคียงกับที่ศวพ.สุพรรณบุรี และพบความแปรปรวนในประชากรด้วงหมัดผัก โดยมีการเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 – 8 โดยในสัปดาห์ที่ 8 พบปริมาณด้วงหมัดผักในกรรมวิธีที่ใช้ fipronil 5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร กรรมวิธีที่ใส่เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม อัตรา 100 กรัม และกรรมวิธีที่ใส่ น้ำเปล่าที่ 6, 4 และ 3.75 ตัว/แปลงย่อย ส่วนกรรมวิธีที่ใส่เชื้อราเขียวเมตาไรเซียม อัตรา 200 กรัม และ 300 กรัม พบปริมาณด้วงหมัดผัก 15 และ 14 ตัว/แปลงย่อย (ตารางที่ 3)

เมื่อครบอายุเก็บเกี่ยว 45 วัน (สัปดาห์ที่ 8) สุ่มผักกาดหัวในแปลงจำนวน 64 หัว/พ.ท. 4 $ม^2$ มาชั่งน้ำหนักผลผลิต และในจำนวนนี้แบ่งหัวผักกาดจำนวน 20 หัวมาเช็ครอยทำลายที่เกิดจากตัวอ่อนด้วงหมัดผัก เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบน้ำหนักผักกาดหัว (ก.ก./พ.ท. 4 $ม^2$) ของศวพ.สุพรรณบุรี พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกกรรมวิธีที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 4) ส่วนในพื้นที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี พบว่า กรรมวิธีที่ใช้ Fipronil 5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร ให้น้ำหนักผักกาดหัวมากกว่าในกรรมวิธีอื่น 19.35 ก.ก./พ.ท. 4 $ม^2$ (ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาระดับการทำลายผักกาดหัวของด้วงหมัดผักพบว่า ที่ศวพ.สุพรรณบุรี กรรมวิธีที่ใช้ Fipronil 5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร พบร่องรอยการทำลายผักกาดหัวมากกว่าในกรรมวิธีอื่นโดยอยู่ที่ระดับ 2.4 ส่วนกรรมวิธีที่เหลือระดับการทำลายไม่มีความแตกต่างกัน ในพื้นที่ อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี

พบว่าการใช้ราเขียว 100 กรัม มีร่องรอยการทำลายผักกาดหัวที่ระดับ 2.288 ส่วนกรรมวิธีที่เหลือระดับการทำลายไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 6)

จากการทดลองทั้ง 2 พื้นที่ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า การใช้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3 ไม่สามารถควบคุมปริมาณประชากรด้วงหมัดผักได้ เนื่องจากในแต่ละกรรมวิธีมีจำนวนด้วงหมัดผักไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมคือการใช้น้ำเปล่า การทดลองในสภาพไร่ครั้งนี้ถือเป็นการทดลองเบื้องต้น การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวไอโซเลท M3 ในสภาพไร่ให้ผลในการทดสอบประสิทธิภาพแตกต่างจากในห้องปฏิบัติการ ซึ่งน่าจะมาจากหลายสาเหตุ ได้แก่ การพ่นเชื้ออาจไม่ได้สัมผัสกับแมลงโดยตรง การไม่สามารถควบคุมความชื้นในระหว่างการทดลอง ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ใช้อาจจะน้อยเกินไป เชื้อกระจายตัวไม่ทั่วถึง ฯลฯ และเนื่องจากการทดลองนี้มีระยะเวลาที่ค่อนข้างจำกัดถึงแม้จะทำใน 2 พื้นที่ แต่ทำในช่วงฤดูปลูกเดียว ซึ่งมีระยะเวลาค่อนข้างสั้นและไม่ได้มีการทดลองซ้ำในพื้นที่เดิม การทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับประภาพรและคณะ (2556) ที่ได้คัดเลือกเชื้อราขาว (*Beauveria bassiana*) ที่มีประสิทธิภาพดีในการใช้ควบคุมมอดเจาะผลกาแฟในห้องปฏิบัติการ และได้นำเชื้อดังกล่าวมาขยายผลทดสอบประสิทธิภาพต่อในสภาพไร่ ผลการทดสอบในครั้งนั้นพบว่า เชื้อราขาว (*B. bassiana*) ที่นำมาทดสอบสามารถลดการระบาดของมอดเจาะผลกาแฟได้ดีในปีที่ 2 ของการทดลอง ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากเกิดการสะสมของเชื้อราที่เพิ่มขึ้นเมื่อมีการฉีดพ่นในปีที่ 2 ของการทดลอง สอดคล้องกับ Ruales (1997) ที่กล่าวว่าโคนิเดียเชื้อรา *B. bassiana* สามารถมีชีวิตรอดได้ข้ามฤดูเก็บเกี่ยว จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการนำเชื้อราโรคแมลงไปใช้ในสภาพไร่จำเป็นต้องให้เชื้อราในปริมาณที่มากพอที่เชื้อจะสามารถอยู่รอดและสถาปนาตัวเองอยู่ได้ในธรรมชาติ การทดลองในครั้งแรกทำในพื้นที่ที่ไม่เคยมีการใช้เชื้อราเขียวเมตาไรเซียมมาก่อน ดังนั้นเชื้อที่ใช้อาจน้อยเกินไปและช่วงที่พ่นเชื้ออาจจะไม่ถูกตัวแมลงเป้าหมายโดยตรง ดังนั้นจึงให้ผลตรงข้ามกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

ในอนาคตน่าจะต้องทำการทดลองซ้ำเพื่อหาเทคนิคการใช้เชื้อที่เหมาะสม ซึ่งอาจจะเพิ่มระยะเวลาในการทดลอง และเพิ่มอัตราการใช้ราเขียวเมตาไรเซียมให้มากขึ้น การให้น้ำเพื่อเพิ่มความชื้นในดินก่อนการใส่เชื้อราเขียว รวมทั้งการเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้เชื้อราชนิดนี้ และการทดสอบเชื้อราโรคแมลงในสภาพไร่ควรได้รับระยะเวลาในการทดลองไม่น้อยกว่า 2 ปี เพื่อพิสูจน์ผลการทดลอง เนื่องจากเชื้อไอโซเลทที่เลือกมาให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมด้วงหมัดผักในห้องปฏิบัติการ แต่เมื่อนำไปใช้ในสภาพไร่กลับให้ผลที่แตกต่างซึ่งอาจเกิดจากระยะเวลาและเทคนิคการใช้ที่ไม่เหมาะสม และน่าจะมีการทดสอบเชื้อที่เหลืออีก 2 ไอโซเลทคือ M5 และ M7 ด้วยในอนาคต

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยการติดเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลทต่างๆกับด้วงหมัดผักหลังการทดสอบ 4 วัน ที่ความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อที่ 1X10^{9} โคนิเดีย/มล.

ไอโซเลทเชื้อราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลทต่างๆ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม
Mo	88.75 [1/] ab
M1	90.00 ab
M2	95.00 a
M3	100 a
M4	73.75 b
M5	100 a
M6	85.00 ab
M7	100 a
M8	97.50 a
M9	91.25 ab
น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ	0 c
CV	14.1%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนด้วงหมัดผักในพื้นที่แปลงศูนย์เรียนรู้ทฤษฎีใหม่ตามแนวพระราชดำริฯ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี ในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน 2556

กรรมวิธี (/ น้ำ 20 ลิตร)	จำนวนด้วงหมัดผักหลังปลูก							
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์	5 สัปดาห์	6 สัปดาห์	7 สัปดาห์	8 สัปดาห์
ราเขียว 100 กรัม	0 a	1.500 a	3.250 ab	5.000 a	8.000 a	28.250 a	48.500 a	57.250 ab
ราเขียว 200 กรัม	0.500 a	1.000 a	2.250 ab	8.750 a	7.250 a	30.500 a	43.750 a	42.750 ab
ราเขียว 300 กรัม	0.250 a	2.500 a	4.250 b	7.000 a	9.000 a	32.500 a	44.500 a	40.750 a
Fipronil5% SC 50 มล.	0 a	1.000 a	1.500 ab	6.500 a	7.500 a	38.750 a	33.000 a	52.500 ab
น้ำเปล่า	0 a	1.750 a	0.250 a	9.500 a	7.000 a	43.500 a	47.750 a	57.750 b
CV	344.1%	90.1%	87.1%	57.6%	55.3%	35%	25.2%	20%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนด้วงหมัดผัก อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี ในช่วงเดือนเมษายน – มิถุนายน 2556

กรรมวิธี (/ น้ำ 20 ลิตร)	จำนวนด้วงหมัดผักหลังปลูก							
	1 สัปดาห์	2 สัปดาห์	3 สัปดาห์	4 สัปดาห์	5 สัปดาห์	6 สัปดาห์	7 สัปดาห์	8 สัปดาห์
ราเขียว 100 กรัม	2.500 ab	3.253 a	2.500 a	4.000 ab	14.000 a	9.500 a	8.000 a	4.000 a
ราเขียว 200 กรัม	2.000 ab	0.250 a	2.000 a	3.750 ab	8.000 a	12.500 a	11.750 ab	15.000 b
ราเขียว 300 กรัม	2.250 ab	1.500 a	1.500 a	1.500 a	8.750 a	12.250 a	16.500 b	14.000 b
Fipronil5% SC 50 มล.	4.250 b	1.250 a	4.250 a	3.500 ab	9.250 a	8.500 a	6.000 a	6.000 ab
น้ำเปล่า	1.750 a	0.750 a	2.750 a	6.250 b	10.500 a	13.500 a	6.750 a	3.750 a
CV	58.1%	137.9%	94.4%	58.2%	38.2%	38.9%	37.1%	67%

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น)

ตารางที่ 4 ตารางเก็บผลผลิต ผักกาดหัวจำนวน 64 หัวในพื้นที่สุ่ม 4 ตารางเมตร ในพื้นที่ศวพ.สุพรรณบุรี

กรรมวิธี (/ น้ำ 20 ลิตร)	น.น.ผักกาดหัว (ก.ก./พ.ท. 4 ม^2)
ราเขียว 100 กรัม	12.275 1/ a
ราเขียว 200 กรัม	12.525 a
ราเขียว 300 กรัม	12.025 a
Fipronil5% SC 50 มล.	13.925 a
น้ำเปล่า	14.175 a
CV	12.4%

1/ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น)

ตารางที่ 5 ตารางเก็บผลผลิต ผักกาดหัวจำนวน 64 หัวในพื้นที่สุ่ม 4 ตารางเมตร ในพื้นที่อ.ท่ามะกา จ. กาญจนบุรี

กรรมวิธี	น.น.ผักกาด (ก.ก./พ.ท. 4 ม^2)
ราเขียว 100 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร	10.125[1/] b
ราเขียว 200 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร	10.250 b
ราเขียว 300 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร	9.150 b
Fipronil5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร	19.350 a
น้ำเปล่า	13.300 b
CV	22.4%

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำๆ ละ 20 ต้น)

ตารางที่ 6 แสดงระดับการทำลายผักกาดหัวของด้วงหมัดผัก

กรรมวิธี	ระดับการทำลายผักกาดหัวของด้วงหมัดผัก[1/]	
	ศวพ.สุพรรณบุรี	อ.ท่ามะกา จ.กาญจนบุรี
ราเขียว 100 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร	1.975[2/] a	2.288 b
ราเขียว 200 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร	2.113 a	1.975 a
ราเขียว 300 กรัม/ น้ำ 20 ลิตร	1.900 a	1.975 a
Fipronil5% SC 50 มล./ น้ำ 20 ลิตร	2.400 b	2.075 ab
น้ำเปล่า	2.050 a	2.175 ab
CV	7.3%	6.9%

[1/] ระดับการทำลายผักกาดหัวของด้วงหมัดผัก แบ่งเป็น 7 ระดับ ตามร่องรอยการทำลาย
ระดับที่ 1 ไม่พบร่องรอยการทำลาย 0%
ระดับที่ 2 พบร่องรอยการทำลายในช่วง 1 – 10%
ระดับที่ 3 พบร่องรอยการทำลายในช่วง 11 – 20%
ระดับที่ 4 พบร่องรอยการทำลายในช่วง 21 – 30%
ระดับที่ 5 พบร่องรอยการทำลายในช่วง 31 – 40%
ระดับที่ 6 พบร่องรอยการทำลายในช่วง 41 – 50%
ระดับที่ 7 พบร่องรอยการทำลายในช่วง >50%

[2/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี DMRT (ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำๆ ละ 20 หัว)

การทดลองที่2.3.4 ประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดในการควบคุมแมลงหวี่ขาว (white fly)

ผลการดำเนินการ

ดำเนินการส่งตัวอย่างเชื้อราไอโซเลท *Paecilomyces* sp., *Lecanicillium* sp. และ *Isaria* sp. ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ ไปจำแนกชนิดที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมตามมติในที่ประชุมคณะกรรมการพิจารณาทะเบียนวิจัยปี 2557 ผลการวิเคราะห์ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง 2 สายพันธุ์คือ *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* ส่วน *Lecanicillium* sp. พบว่าเป็นชนิดเดียวกับ *Paecilomyces lilacinus* จากนั้นได้ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสายพันธุ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ

ปีที่ 1 เริ่มทำงานทดสอบในช่วงหน้าฝน ทำให้ไม่พบการระบาดของแมลงหวี่ขาว การเก็บแมลงหวี่ขาวมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการสามารถเก็บแมลงได้ในปริมาณไม่มาก การเตรียมพืชอาศัยของแมลงหวี่ขาว ได้แก่ ต้นมะเขือ และต้นฝรั่ง ในกรงเลี้ยงแมลง แล้วปล่อยแมลงหวี่ขาวที่เก็บได้บนพืชอาหารที่เตรียม พบว่ายังไม่สามารถเลี้ยงขยายได้ จำเป็นต้องรอให้ผ่านช่วงฤดูฝน เพื่อให้เกิดการระบาดของแมลงตามธรรมชาติจึงจะสามารถเก็บมาทดสอบประสิทธิภาพเชื้อได้

ปีที่ 2 เริ่มทำงานทดสอบ โดยออกสำรวจและเก็บแมลงหวี่ขาว ซึ่งในครั้งนี้ได้แมลงหวี่ขาวจากแปลงมะเขือเปราะ *Bemisia tabaci* Gennadius ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยใช้เชื้อที่มีในห้องปฏิบัติการได้แก่ *Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* โดยได้ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง

ผลการทดสอบครั้งที่ 1 พบว่า ในวันที่ 2 ของการทดลองเริ่มพบแมลงหวี่ขาวติดเชื้อรา *B. bassiana* โดยพบที่ 6% แตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปอร์เซ็นต์แมลงหวี่ขาวที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงส่วนใหญ่จะเริ่มพบหลังทดสอบเชื้อวันที่ 3 และ 4 ตามลำดับ โดยพบว่าแต่ละไอโซเลท สามารถทำให้แมลงหวี่ขาวติดเชื้อได้ใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยในวันที่ 4 ของการทดลองพบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 54 – 65% (Table 1)

ผลการทดสอบครั้งที่ 2 พบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงส่วนใหญ่หลังการทดสอบในวันที่ 3 และ 4 ของการทดลอง โดยในวันที่ 3 พบว่าแมลงหวี่ขาวติดเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* มากที่สุด 61% แตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อ *Beauveria bassiana, Isaria javanica* และ *Metarhizium anisopliae* พบการติดเชื้อราที่ 21, 31 และ 24% ตามลำดับ แต่ในวันที่ 4 ของการทดลองพบว่า แต่ละไอโซเลทสามารถทำให้แมลงหวี่ขาวติดเชื้อได้ใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยพบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 62 – 72% (Table 2)

ผลการทดสอบครั้งที่ 3 พบว่า แต่ละไอโซเลทสามารถทำให้แมลงหวี่ขาวติดเชื้อได้ใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยเริ่มพบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในวันที่ 2 ของการทดลอง พบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 13 – 16% เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเริ่มพบมากขึ้นหลังทดสอบเชื้อในวันที่ 3 และ 4 โดยหลังทดสอบวันที่ 3 พบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 25 – 39% และหลังทดสอบวันที่ 4 พบการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 60 – 68% ตามลำดับ โดยยังคงพบในอัตราใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (Table 3)

จากผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันคือเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ทำการทดสอบได้แก่ *Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* สามารถทำให้แมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* Gennadius มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อได้ใกล้เคียงกัน โดยพบว่าเชื้อรา *Isaria javanica* ทำให้เกิดการติดเชื้อสูงสุดที่ 72% แต่อย่างไรก็ดีค่าเฉลี่ยการติดเชื้อของ

แมลงหวี่ขาว *Bemisia tabaci* Gennadius ในห้องปฏิบัติการครั้งนี้โดยเฉลี่ยไม่สูงมากนัก ซึ่งอาจเป็นเพราะแมลงหวี่ขาวที่ใช้ทำการทดสอบไม่ได้เป็นแมลงศัตรูเป้าหมายของเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาทดลอง โดย *Metarhizium anisopliae* เป็นเชื้อไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์จากด้วงหนวดยาวอ้อย *Beauveria bassiana* เป็นเชื้อที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรซึ่งแยกเชื้อบริสุทธิ์จากมอดเจาะเมล็ดกาแฟ ส่วน *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* เป็นเชื้อราของห้องปฏิบัติการเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ที่ จ.สุพรรณบุรี ปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในแมลงขึ้นอยู่กับแมลงอาศัย ความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง เช่น ในระยะตัวหนอน ดักแด้ หรือตัวเต็มวัย และสภาพแวดล้อม ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ แสง และ ความชื้น (Boucias, D.G. and Pendland, 1998) ในการทดลองนี้ใช้แมลงหวี่ขาวยาสูบ: *Bemisia tabaci* Gennadius ซึ่งไม่ได้เป็นแมลงศัตรูเป้าหมายของเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ จึงอาจเป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงไม่สูงมากนักในห้องปฏิบัติการ

จากรายงานในปี ค.ศ. 1979 ได้เริ่มนำเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson ซึ่งเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมและป้องกันกำจัดไส้เดือนฝอย สามารถเข้าทำลายระยะไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม นอกจากนี้ *P. lilacinus* ยังได้รับการพิจารณาให้ผลิตในเชิงการค้าเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในดินในเขตร้อน และเขตกึ่งร้อน ส่วนเชื้อ *P. fumosoroseus* (Wize) เป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการใช้ควบคุมแมลงหวี่ขาว ที่เป็นสาเหตุของโรค มีการเรียกเชื้อราชนิดนี้ว่า “yellow Muscardine” มีรายงานการใช้เชื้อชนิดนี้ในการควบคุมแมลงหวี่ขาว; *Bemisia tabasi* และ *Trialeurodes* spp. ทั้งในโรงเรือนทดลองและในสภาพไร่ โดยใช้ควบคุมตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว เส้นใยเชื้อชนิดนี้จะเจริญปกคลุมบนตัวแมลงหวี่ขาว เชื้อจะแทงเข้าไปเข้าไปในใบพืชและจะตรึงเหยื่อไว้กับใบพืช ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวจะถูกปกคลุมด้วยเส้นใยและโคนิเดียของเชื้อมีลักษณะฟูและเบา (Sandhu *et al*., 2012) ***Isaria*** *fumosorosea* (Wize) Brown & Smith เป็นเชื้อราที่ใช้กำจัดศัตรูพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้ในการควบคุมแมลงหวี่ขาวทั้งในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และจีน ซึ่งสามารถใช้ได้ดีทั้งในเรือนกระจก และพื้นที่เปิดโล่ง (Huang *et al*., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่า ***I.*** *fumosorosea* สามารถใช้ควบคุมตัวอ่อนแมลงหวี่ขาว; *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) ระยะที่ 4 ได้ผลดี (D’Alessandro *et al*., 2011) ส่วน *Isaria tenuipes* Peck พบเป็น parasite ในระยะดักแด้และตัวหนอนของหนอนผีเสื้อหลายชนิด ส่วนใหญ่มักพบในป่า โดยจะเห็นเป็นเส้นใย synnemata สีเหลืองเจริญงอกออกมาจากตัวแมลง ซึ่งเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Vega-Aquino *et al*., 2010)

จากข้อมูลที่รายงานดังกล่าว จะเห็นได้ว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงศัตรูเป้าหมาย ดังนั้นการนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด ควรมีการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นกับแมลงศัตรูพืชหลายๆ กลุ่ม/ชนิด เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกเชื้อราไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

Table 1 The average percent mortality of *Bemisia tabaci* Gennadius at the first experiment treated with 4 different of fungus isolates incubated at ambient temperature and observed for 4 days.

Insect fungi	percent mortality of *B. tabaci* [1/] after treated			
	day 1	day 2	day 3	day 4
Beauveria bassiana	0.00 a[2/]	6.00 a	36.00 a	55.00 a
Isaria javanica	0.00 a	0.00 b	27.00 a	54.00 a
Metarhizium anisopliae	0.00 a	0.00 b	31.00 a	60.00 a
Paecilomyces lilacinus	0.00 a	0.00 b	25.00 a	65.00 a
Control (distilled water)	0.00 a	0.00 b	0.00 b	0.00 b
CV (%)	223.6	305.8	62.5	26.9

[1/] Average of 5 replications, 20 adults/ replication

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 2 The average percent mortality of *Bemisia tabaci* Gennadius at the second experiment treated with 4 different of fungus isolates incubated at ambient temperature and observed for 4 days.

Insect fungi	percent mortality of *B. tabaci* [1/] after treated			
	day 1	day 2	day 3	day 4
Beauveria bassiana	0.00 a[2/]	0.00 a[2/]	21.00 b	63.00 a
Isaria javanica	0.00 a	0.00 a	31.00 b	72.00 a
Metarhizium anisopliae	0.00 a	0.00 a	24.00 b	62.00 a
Paecilomyces lilacinus	0.00 a	0.00 a	61.00 a	69.00 a
Control (distilled water)	0.00 a	0.00 a	0.00 c	0.00 b
CV (%)	223.6	223.6	34.4	26.4

[1/] Average of 5 replications, 20 adults/ replication

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

Table 3 The average percent mortality of *Bemisia tabaci* Gennadius at the third experiment treated with 4 different of fungus isolates incubated at ambient temperature and observed for 4 days.

Insect fungi	percent mortality of *B. tabaci* [1/] after treated			
	day 1	day 2	day 3	day 4
Beauveria bassiana	0.00 a[2/]	14.00 a	39.00 a	67.00 a
Isaria javanica	0.00 a	13.00 a	29.00 a	64.00 a
Metarhizium anisopliae	0.00 a	16.00 a	25.00 a	60.00 a
Paecilomyces lilacinus	0.00 a	16.00 a	34.00 a	68.00 a
Control (distilled water)	0.00 a	0.00 a	0.00 b	0.00 b
CV (%)	223.6	137.2	47.5	20.6

[1/] Average of 5 replications, 20 adults/ replication

[2/] In column, means followed by the same letter were not significantly different at the 95% level by DMRT.

กิจกรรมย่อยที่ 2.4. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.4.1 เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema riobrave*

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1. ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่เหมาะสมในการเลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ดำเนินการทดลองด้วยวิธี Paper bioassay ใช้จานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJs) เข้มข้น 3 อัตรา คือ 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวในน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร และที่อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เข้าทำลายและทำให้หนอนกินรังผึ้งตาย เท่ากับ 82-100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบหนอนกินรังผึ้งตายสูงสุดเมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเข้มข้นเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร เท่ากับ 97 และ100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือไส้เดือนฝอยเข้มข้นเริ่มต้น 3,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร และ 0.4 มิลลิลิตร เท่ากับ 89 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อัตราความเข้มข้นเริ่มต้นของไส้เดือนฝอย 2000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร และ 0.4 มิลลิลิตร พบหนอนกินรังผึ้งตายเท่ากับ 88 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 1)

ปริมาณน้ำที่ใช้ในทุกความเข้มข้นมีผลในการทำให้หนอนกินรังผึ้งตายแตกต่างกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไส้เดือนฝอยเริ่มต้น แต่ลดปริมาณน้ำลง พบหนอนกินรังผึ้งตายลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณน้ำที่ลดลงหมายถึงความชื้นต่อหน่วยพื้นที่ทดลองลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ค้นหาแมลงและเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เป็นไปได้ไม่ง่ายและล่าช้าลง ทั้งนี้การทำให้แมลงตายของไส้เดือนฝอยจะเกิดขึ้นภายหลังจากไส้เดือนฝอยค้นหาแมลงพบและเจาะผ่านเข้าสู่ตัวแมลงโดยผ่านทางช่อง

เปิดธรรมชาติ เช่น ช่องว่างระหว่างข้อปล้องของหนอน ปาก เป็นต้น ภายหลังจากไส้เดือนฝอยผ่านเข้าสู่ตัวแมลงสำเร็จแล้ว ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงจะพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะต่างๆ จนเป็นตัวเต็มวัยขยายพันธุ์ อยู่ภายในซากของแมลงโดยอาศัยของเหลวในตัวแมลงเป็นอาหาร ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่เข้าสู่ตัวหนอนกินรังผึ้ง เจริญเติบโตอยู่ภายในซากหนอนกินรังผึ้งวัย 5 นั้น ใช้เวลาประมาณ 10-12 วัน ภายหลังการล่อให้ไส้เดือนฝอยที่พัฒนาอยู่ภายในซากแมลงจนเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงออกจากซากแมลงเคลื่อนที่ลงสู่น้ำที่หล่อไว้ในกล่องชื้น โดยพบการเคลื่อนย้ายของไส้เดือนฝอยออกจากซากแมลงลงสู่น้ำที่หล่อไว้ในวันที่ 10 หลังหนอนตาย ซึ่งได้ทำการเทเก็บไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำสะอาดที่หล่อไว้ทุกวัน นำน้ำไส้เดือนฝอยมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษซากหนอนที่อาจปนเปื้อนมา จากนั้นนำสารแขวนลอยที่มีไส้เดือนฝอยที่สะอาดอยู่มานับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่ละกรรมวิธี พบว่าจำนวนไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่เลี้ยงขยายด้วยหนอนกินรังผึ้ง เมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้ผลผลิตเฉลี่ยต่อหนอนหนอนกินรังผึ้งหนึ่งตัวเท่ากับ 2.10×10^5 - 3.60×10^5 ตัว เมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง สูงสุด 3.60×10^5 ตัว รองลงมาคือไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง 2.80×10^5 ตัว และไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 2,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง 2.40×10^5 ตัว เมื่อลดปริมาณน้ำที่ใช้ลง พบว่า การใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง สูงกว่ารองลงมาคือ ใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 และ 2,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง เท่ากับ 3.40×10^5, 2.60×10^5 และ 2.10×10^5 ตัว ตามลำดับ (Figure 2)

เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงขยายได้จากทุกกรรมวิธี นำมาทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ตามวิธีการของ Miller (1989) โดยใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ (ถาด) ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอยเลี้ยงขยายได้จากทุกกรรมวิธี มีคุณภาพโดยทำให้แมลงตายไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว พบว่า เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารไข่ โดยการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 10,000 ตัว สามารถผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงได้สูงสุดเท่ากับ 2.2×10^6 ตัวตัวต่ออาหาร 40 กรัม มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 20,000-30,000 ตัว ซึ่งสามารถผลิตไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลงได้เท่ากับ 1.6×10^6 ตัว การเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นเป็น 40,000 ตัวต่ออาหาร 40 กรัม สามารถผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงได้เท่ากับ 1.95×10^6 ตัวต่ออาหาร 40 กรัม (Figure 3) ทั้งนี้จะเห็นว่าการเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นและปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงอาจมีความสัมพันธ์ต่อจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย

การทดลองที่ 3 ศึกษาวัสดุที่ใช้ในการเก็บรักษาต่ออายุและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* พบว่า วัสดุอุ้มความชื้น 3 ชนิด ได้แก่ ฟองน้ำสังเคราะห์ ดินเหนียว และ โพลิเมอร์ ที่ใช้ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลงซึ่งได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียม พบว่า ที่ 10 องศาเซลเซียส วิธีการเก็บไส้เดือนฝอยในชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ และ โพลิเมอร์ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีชีวิตรอดดีและมีแนวโน้มเก็บได้นานกว่าวิธีการเก็บไส้เดือนฝอยในผงดินในถุงพลาสติกซึ่งผงดินมีการสูญเสียความชื้นภายในถุงสูงกว่าโพลิเมอร์และฟองน้ำ และที่ 25 องศาเซลเซียส

การเก็บไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในโพลิเมอร์ไส้เดือนฝอยมีแนวโน้มมีชีวิตรอดสูงกว่าในดินและฟองน้ำที่ระยะเวลาการเก็บเท่ากัน

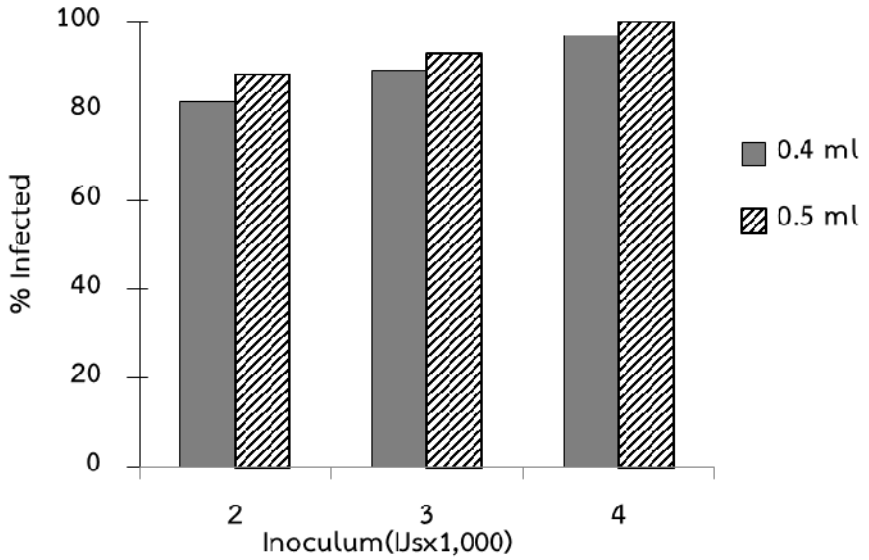


Figure 1 Effects of *Steinernema riobravae* inoculum concentration on infection in *Galleria mellonella*.

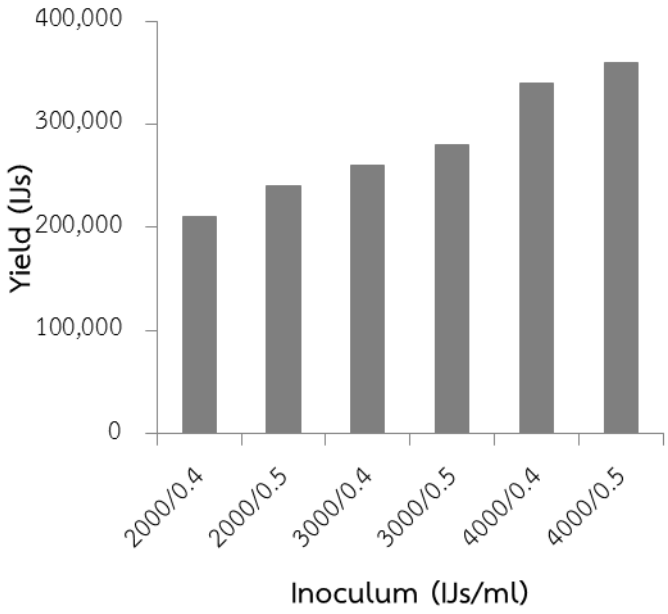


Figure 2 Number of *Steinernema riobrave* infective juveniles reproduced per insect host

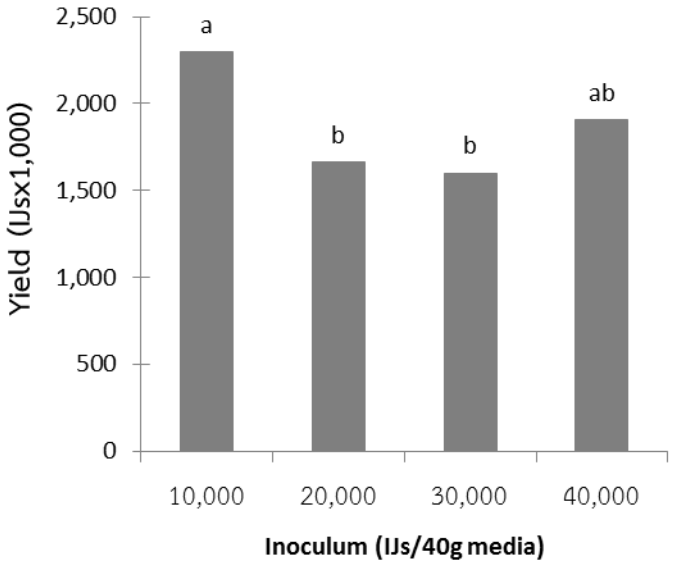


Figure 3 Number of *Steinernema riobrave* infective juveniles reproduced per media.

การทดลองที่ 2.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ในการควบคุมด้วงหมัดผักแถบลาย *Phyllotreta sinuata* (Stephens)

ผลการทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1. ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของด้วงหมัดผักแถบลายเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับใช้ในการบริหารจัดการด้วงหมัดผักที่เหมาะสม จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างด้วงหมัดผักจากแปลงเกษตรกร อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี นำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยการเลี้ยงตัวเต็มวัยในกล่องพลาสติกขนาด 12x17x6 เซนติเมตร ภายในใส่ใบกวางตุ้งเพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัย และเพื่อให้ตัวเต็มวัยจับวางไข่ ทำการเปลี่ยนพืชอาหารทุก 2 วัน ตรวจหาไข่บนใบกวางตุ้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์เตอริโอ พบว่า ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยว หรืออาจวางเป็นกลุ่มบนใบพืชใกล้กาบใบ ไข่ มีขนาดเล็กรูปวงรีสีขาว ผิวเรียบเป็นมัน ไข่มีขนาดความกว้าง 0.25 มิลลิเมตร และยาว 0.35 มิลลิเมตร ทำการแยกเลี้ยงไข่และตัวอ่อน ตามวิธีการของจอมสุรางค์ และคณะ (2550) ในกล่องพลาสติก ขนาด 9x13x4 เซนติเมตร ภายในใส่ดินร่วนปนทราย พรมน้ำให้ชุ่ม ก่อนวางใบกวางตุ้งที่มีไข่ของด้วงหมัดผักแถบลายลงบนดิน ไข่ใช้เวลา 3 วันจึงฟักออกเป็นหนอน ซึ่งมี 3 วัย หนอนวัย 1 มีลักษณะบางใส หัวสีดำ มีขาจริง 3 คู่ เคลื่อนไหวรวดเร็ว หนอนที่เพิ่งฟักออกจากไข่ มีลำตัวบางใส แผ่นแข็งด้านบนท้องปล้องสุดท้าย (anal plate) มีสีขาวใสเป็นมัน ลำตัวแบ่งออกเป็นปล้องๆ ไม่ชัดเจนแต่ละปล้องของหนอนมีจุดสีน้ำตาล เมื่อหนอนเริ่มกินอาหารลำตัวมีสีเหลืองใส ส่วนหัวและส้นหลังอกปล้องแรกเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม แผ่นแข็งบนท้องปล้องสุดท้ายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ขนาดลำตัวยาว 2.66 มิลลิเมตร กว้าง 0.26 มิลลิเมตร หนอนวัยที่ 2 มีลักษณะทางสรีรวิทยาคล้ายกับหนอนวัยที่ 1 ลำตัวมีขนาดใหญ่ขึ้น แบ่งออกเป็นปล้องๆ เห็นชัดเจนมีทั้งหมด 11 ปล้อง ขนาดลำตัวยาว 3.36 มิลลิเมตร กว้าง 0.41 มิลลิเมตร หนอนวัย 3 มีสีเหลืองครีม เคลื่อนไหวช้า ขนาดความกว้างของหัวกะโหลก 0.28 มิลลิเมตร และลำตัวยาว 4.21 มิลลิเมตร กว้าง 0.56 มิลลิเมตร เมื่อหนอนโตเต็มที่มีขนาดลำตัวใหญ่อ้วนกลม ขนาด 0.69 มิลลิเมตร ระยะก่อนเข้าดักแด้หนอนจะกินอาหารลดลง ลำตัวเริ่มหดสั้น และโค้งงอเป็นรูปตัวซี ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำระยะนี้แมลงไม่มีการเคลื่อนไหว ระยะดักแด้ มีรูปร่างแบบ exarate pupa คือ มีปีกและขาแยกออกจากลำตัวเป็นอิสระเคลื่อนไหวได้ ลำตัวดักแด้มีขนาดเล็ก ยาว 2.18 มิลลิเมตร และกว้าง 0.90

มิลลิเมตร (Table 1) เมื่อเข้าดักแด้ ใหม่ ๆ มีสีขาวใสเป็นมัน ตารวมมีสีขาว และสีเข้มขึ้นเมื่อดักแด้มีอายุมากขึ้น เมื่อดักแด้ใกล้ฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย ส่วนที่เป็นหัว หนวด ขา และปีกเปลี่ยนเป็นสีค่อนข้างดำ ดักแด้ใช้เวลาในการเจริญเติบโต 6-9 วันจึงพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย (Table 2) วงจรชีวิตที่สมบูรณ์จากระยะไข่ถึงตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 19-25 วัน (Fig.1) เช่นเดียวกับการศึกษาของ จอมสุรางค์ และคณะ (2550) พบว่า ระยะไข่และหนอนวัยที่ 1 ของด้วงหมัดผักชนิด *Phyllotreta flexuosa* มีอัตราการตายสูงโดยมีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น พันธุกรรมของแมลง ความสมบูรณ์แข็งแรงของเพศเมีย ประสิทธิภาพของการผสมพันธุ์ สรีรวิทยา และโครงสร้างของไข่ และโครงสร้างของหนอนมีขนาดเล็กบอบบาง จึงมีโอกาสถูกกระแทกทำให้เกิดบาดแผลและตายได้โดยง่าย

การทดลองย่อยที่ 2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *Steinernema riobrave* ในการเข้าทำลายด้วงหมัดผักระยะตัวเต็มวัย ดำเนินการทดลองโดยวิธี paper bioassay วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำ (จาน) ซ้ำละ 10 ตัว เตรียมไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เข้มข้น 2,000, 10,000 และ 20,000 หยดลงบนกระดาษกรองในจานทดลอง พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ทุกอัตราความเข้มข้น มีประสิทธิภาพทำให้ด้วงหมัดผักตายภายในเวลา 2 วัน เท่ากับ 13, 18 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการตายของด้วงหมัดผักเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจาก 2 เป็น 3, 4 และ 5 วัน โดยที่ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 10,000 20,000 ตัว มีประสิทธิภาพทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงสุด ภายในเวลา 3 - 5 วัน เท่ากับ 40-80 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างทางสิติกับไส้เดือนฝอยอัตรา 2,000 ตัว (Table 3) เมื่อนำด้วงหมัดผักที่ตายมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยการใช้เข็มเขี่ยแยกซากด้วงหมัดผักและหยดสารละลาย pepsin solution ไม่พบการพัฒนาของไส้เดือนฝอยในด้วงหมัดผัก

การทดลองย่อยที่ 3. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายด้วงหมัดผักระยะตัวเต็มวัยที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส ดำเนินการทดลองด้วยวิธี paper bioassay ตามวิธีการของ Glazer *et al*. (2002) โดยใช้จานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ภายในรองก้นด้วยกระดาษกรองจำนวน 1 แผ่น วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 10 ซ้ำละ 10 ตัว จำนวน 6 กรรมวิธี คือ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตราความเข้มข้น 0, 500, 1,000, 2,000, 4,000 และ 8,000 ตัวในน้ำ 500 ไมโครลิตร

จาก Table 4 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 8,000 ตัว มีประสิทธิภาพเข้าทำลายด้วงหมัดผักตัวเต็มวัยได้ ภายในเวลา 2 วัน พบการตายของด้วงหมัดผักสูงสุด 10 เปอร์เซ็นต์ มีแตกต่างทางสถิติกับทุกอัตราความเข้มข้น

ที่ 3 วัน พบ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 8,000 ตัว ทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงสุด 36 เปอร์เซ็นต์แตกต่างทางสถิติกับที่อัตรา 4,000 และ 2,000 ตัว (18 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ที่อัตรา 500 และ 1,000 พบเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผักระยะตัวเต็มวัยต่ำสุดเท่ากับ 3 และ 6 ตามลำดับ

ที่ 4 วัน ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 8,000 ตัว ทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงสุดเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่อัตรา 4,000 ตัว (เท่ากับ 35 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับที่อัตรา 2,000, 1,000 และ 5000 ตัว (เท่ากับ 35, 28 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

ที่ 5 วัน พบการตายของด้วงหมัดผักสูงสุด 57 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย *S. riobrave*
8,000 ตัว มีความแตกต่างทางสถิติกับไส้เดือนฝอยทุกอัตรา รองลงมาคือ ที่อัตรา 4,000 ตัว พบการตายเท่ากับ 54 เปอร์เซ็นต์

จาก Table 5 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 8,000 ตัว ทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงสุดเท่ากับ 19 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2 วัน รองลงมาคือที่อัตรา 4,000 ตัว เท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์

ที่เวลา 3 วัน ไส้เดือนฝอย S. *riobrave* อัตรา 8,000 และ 4,000 ตัว ทำให้ด้วงหมัดผักตาย เท่ากับ 40 และ 31 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างทางสถิติกับทุกอัตราความเข้มข้น

ที่เวลา 4 และ 5 วัน ไส้เดือนฝอย S. *riobrave* อัตรา 8,000 ตัว ทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงสุด เท่ากับ 63 และ 80 รองลงมาคือ อัตรา 4,000 ตัว พบการตายของด้วงหมัดผักเท่ากับ 52 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 1 Average length of body and width of head capsule of Striped Flea beetle, *Phyllotreta sinuat*a (Stephen) at each development stage.

Developmental stage	Mean ± S.D. (mm.) [1/]	
	Width	Length
Egg	0.25 ± 0.01	0.35 ± 0.02
larval instar:		
1st	0.26 ± 0.01	2.66 ± 0.01
2nd	0.41 ± 0.00	3.36 ± 0.01
3rd	0.56 ± 0.03	4.21 ± 0.03
pre pupal	0.69 ± 0.01	2.87 ± 0.01
pupal	0.90 ± 0.02	2.18 ± 0.02

[1/] average size ± standard deviation

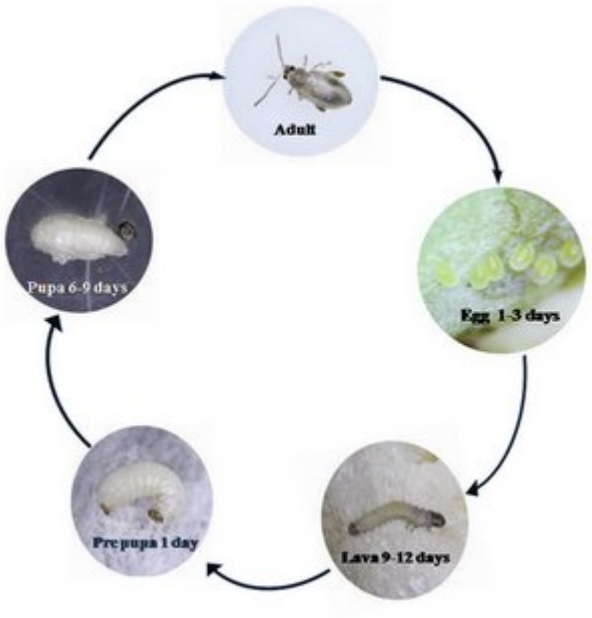


Fig. 1 Life cycle of Striped flea beetle, *Phyllotreta sinuat*a (Stephen).

Table 2 Developmental stages of Striped Flea beetle, *Phyllotreta sinuat*a (Stephen) under laboratory conditions (25.61+0.62 ^{0}C and 92.00+0.25% RH).

Developmental stage	Range (days)
Egg incubation	1 - 3
larval instar:	
1st	3-4
2nd	3-4
3rd	3-4
larval period	9-12
pre pupal	1
pupal period	6-9
Total development period from egg to adult	19-25

Table 3 Percentage mortality of Striped Flea beetle, *Phyllotreta sinuat*a (Stephen) by entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* at different concentrations under laboratory conditions.

Nematode species	Nematode concentration (IJs)	Mortality percentage of *P. sinuat*a caused by *S. riobrave* at different time (days)			
		2	3	4	5
S. riobrave	2,000	13	22 b	27 b	42 b
	10,000	18	40 a	55 a	67 a
	20,000	28	46 a	65 a	80 a
CV (%)		89.2	52.4	38.3	34.0

Table 4. Percentage mortality of Striped Flea beetle, *Phyllotreta sinuat*a (Stephen) by entomopathogenic nematode at different concentrations under laboratory conditions (25 ^{0}C)

Nematode concentration (IJs)	Mortality percentage of *P. sinuat*a caused by entomopathogenic nematode *S. riobrave* at different time (days)			
	2	3	4	5
500	0 b	3 c	7 d	21 d
1,000	0 b	6 c	17 cd	38 c
2,000	2 b	17 b	28 bc	40 bc
4,000	2 b	18 b	35 ab	54 ab
8,000	10 a	36 a	47 a	57 a
CV (%)		77.9	57.4	37.4

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at 95% level by DMRT.

Table 5 Percentage mortality of Striped Flea beetle, *Phyllotreta sinuata* (Stephen) by entomopathogenic nematode at different concentrations under laboratory condition (30 ^{0}C)

Nematode concentration	Mortality percentage of *P. sinuata* caused by entomopathogenic nematode *S. riobrave* at different time (days)			
(IJ)	2	3	4	5
500	0 c	4 b	23 c	46 c
1,000	0 c	17 b	29 c	48 c
2,000	2 bc	17 b	42 b	56 bc
4,000	11 ab	31 a	52 ab	67 ac
8,000	19 a	40 a	63 a	80 a
CV (%)	163.7	67.5	35.3	32.3

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at 95% level by DMRT.

การทดลองที่ 2.4.3 วิจัยและพัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

ผลการทดลอง

1.ศึกษาปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยแมลงอาศัย

นำไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* ระยะเข้าทำลายแมลง มาเจือจางในน้ำกลั่นอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ให้ได้อัตราความหนาแน่นประมาณ 3,000 2,000 1,000 200 100 และ 10 ตัว/น้ำ 0.4 มล. หยดลงบนกระดาษกรองในจานพลาสติกจากนั้นนำหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (วัย 5 - 6) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ในห้องปฏิบัติการ จำนวน 10 ตัว ปล่อยลงไปในจานพลาสติกที่หยดไส้เดือนฝอยแล้ว ปิดฝานำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 48 ชั่วโมง หนอนจะตาย ลักษณะการตายของหนอนกินรังผึ้งด้วย ไส้เดือยฝอย *S.glaseri* นั้น ลำตัวจะเป็นสีดำ นิ่ม ไม่เละ จากการตรวจนับการตายของหนอนกินรังผึ้งในแต่ละความเข้มข้น พบว่าที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย *S.glaseri* 2,000 ตัว มีเปอร์เซ็นต์หนอนกินรังผึ้งตายสูงที่สุด 84.20 % รองลงมาได้แก่ อัตราความหนาแน่น 3,000 1,000 200 100 ตัว มีเปอร์เซ็นต์หนอนกินรังผึ้งตาย 70.40 51.25 16.31 และ 11.17 % ตามลำดับ ส่วนการใช้ไส้เดือนฝอย *S.glaseri* 10 ตัว ไม่พบการตายของกินรังผึ้งแต่อย่างใด ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ตายในแต่ละอัตราความหนาแน่นนั้นอยู่ระหว่าง 5,250-6,500 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว (ตารางที่ 1)

2.ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว

เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยใช้สูตรอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ซึ่งประกอบด้วย

อาหารสุนัข 99 กรัม น้ำมันหมู 22 กรัม หนอนกินรังผึ้ง 11 กรัม น้ำ 331 มิลลิลิตร คลุกเคล้ากับฟองน้ำสังเคราะห์ 36 กรัม

1.นำส่วนผสมทั้งหมด บรรจุใน flask จำนวน 33 กรัม ปิดจุกสำลี นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที

2.เมื่ออาหารเย็นลง เติมแบคทีเรียร่วมอาศัยที่เลี้ยงขยายใน Ys broth เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยจำนวน 3 มล. นำเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.เติม ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* วัย 3 ระยะ IJ ลงเลี้ยงในอัตรา 4,000 5,000 และ 6,000 ตัวต่อ flask เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ จึงทำการเก็บผลผลิต

ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว สามารถเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ให้ได้ปริมาณมากได้โดย ใช้สูตรอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวที่ประกอบด้วยอาหารสุนัข น้ำมันหมู หนอนกินรังผึ้ง และน้ำใส่ไส้เดือนฝอย IJ จำนวน 5000 ตัว/flask เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน สามารถผลิตขยายไส้เดือนฝอย*S. glaseri* ได้ปริมาณมากที่สุดเฉลี่ย 1.3 ล้านตัวต่อ flask

3 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า

เลี้ยงไส้เดือยฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว โดยใช้สูตรอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ประกอบด้วยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต 0.75%วิตามิน และเกลือแร่ 0.50% ไขมัน 0.20% Emulsifier 6.67% และน้ำสะอาด 100 % ยังไม่สามารถเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยให้มีปริมาณมากได้

4. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาไส้ดือนฝอย *Steinernema glaseri*

เก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ที่ผลิตได้ในชิ้นฟองน้ำ โดยบรรจุไส้เดือนฝอยในอัตรา $4x10^6$ ตัว $2x10^6$ ตัว $1x10^6$ ตัว และ $5x10^5$ ตัว เก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ตรวจนับอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงทุกเดือน พบว่าการเก็บรักษาโดยบรรจุไส้เดือนฝอยในชิ้นฟองน้ำ อัตรา $5x10^5$ ตัว สามารถเก็บได้นานที่สุด 4 เดือน โดยยังมีปริมาณและคุณภาพไม่แตกต่างจากที่ผลิตได้(ตารางที่ 3)

การศึกษาปริมาณไส้เดือนฝอยที่เหมาะสม โดยบรรจุไส้เดือนฝอยในอัตรา $4x10^6$ ตัว $2x10^6$ ตัว $1x10^6$ ตัว และ $5x10^5$ ตัว/ถุง เก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ที่ผลิตได้ในชิ้นฟองน้ำ อัตรา $5x10^5$ ตัว สามารถเก็บได้นานที่สุด 4 เดือน โดยยังมีปริมาณและคุณภาพไม่แตกต่างจากเมื่อเริ่มบรรจุ

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในดาวเรือง

ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ที่ผลิตได้ในการควบคุมการควบคุมหนอนกระทู้ผักในดาวเรือง ในแปลงเกษตรกรอำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี คือ การใช้ไส้เดือนฝอยสูตรผงอัตรา 20 30 40 และ 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร. เปรียบเทียบกับ การใช้ BT อัตรา 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และแปลงไม่ควบคุมศัตรูพืช ตรวจนับหนอนก่อนทำการพ่นไส้เดือนฝอยและหลังพ่นไส้เดือนฝอย 5 วัน ตรวจนับปริมาณดอกที่มีคุณภาพและดอกที่ถูกทำลาย นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบทางสถิติ พบว่ากรรมวิธีใช้ไส้เดือนฝอยสูตรผงในอัตรา 40 และ 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร. และการใช้ BTอัตรา 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในดาวเรืองได้ดีที่สุดไม่แตกต่างกันทางสถิติ และแตกต่างจากกรรมวิธีใช้ไส้เดือนฝอยสูตรผงในอัตรา 20 30 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร. และแปลงที่ไม่มีการควบคุมศัตรูพืช กรรมวิธีใช้ไส้เดือนฝอยสูตรผงในอัตรา อัตรา 40 และ 50 ล้านตัว/น้ำ 20 ลิตร. และการใช้ BTอัตรา 80 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณดอกที่ไม่ถูกทำลายสูงที่สุด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

Table 1 Comparative mortarity percentage of wax moth and yield of *steinernema glaseri* due to different innoculum level

innoculum of *S.glaseri*	motarity of wax moth (%)	Yield of *S. glaseri* (IJs/lavae)
3000 IJS	70.40a	6,125
2000 IJS	84.20a	6,500
1000 IJS	51.25b	6,000
200 IJS	16.31c	5,750
100 IJS	11.17c	5,250
10 IJS	0c	0

Table 2 Comparative yield quarity of *steinernema glaseri* from different innoculum level.

innoculum of *S.glaseri*	mortarity percentage of wax moth due to *S.glaseri* 1:1 (%)
3000 IJS	36.19
2000 IJS	38.09
1000 IJS	34.28
200 IJS	32.38
100 IJS	33.33

Table 3 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* maintained in sponge during 6 months at $7^{\circ}C$

No. of IJs/sachet	month					
	1	2	3	4	5	6
$5x10^5$	100	100	98.7	98.7	80.00	75.00
$1x10^6$	100	100	95	80.5	77.5	55.00
$2 x10^6$	100	100	97.5	85	85	36.25
$4 x10^6$	100	75	71.25	57.5	51.25	40

การทดลองที่ 2.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ดำเนินการทดลองในมะลิเพื่อควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิ

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการเข้าทำลายหนอนเจาะดอกมะลิ ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิอัตรา 500 1,000 และ 2,000 ตัว/มล. ในห้องปฏิบัติการพบว่า การใช้ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 และ 2,000 ตัว/มล. หนอนเจาะดอกมะลิมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังทำการทดลอง24 ชั่วโมง ส่วนการใช้ไส้เดือนฝอยอัตรา 500 ตัว/มล หนอนเจาะดอกมะลิมีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ หลังทำการทดลอง 48 ชั่วโมง ส่วนในกรรมวิธีไม่ใช้ไส้เดือนฝอยไม่พบการตายของหนอนเจาะดอกมะลิแต่อย่างใด (ตารางที่ 1)

ทดสอบอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยบนต้นมะลิ หลังจากพ่นไส้เดือนฝอย ในสภาพโรงเรือน

อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยบนต้นมะลิ หลังจากพ่นไส้เดือนฝอย ในสภาพโรงเรือน ที่โรงเรือนกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผง อัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร สามารถคงอยู่บนต้นมะลิได้ประมาณ 67.69 27.36 และ 6.72 เปอร์เซ็นต์หลังจากพ่นไส้เดือนฝอย 24 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่2)

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิในสภาพไร่

ทำการทดสอบอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยบนต้นมะลิในแปลงเกษตรกรที่จังหวัดชลบุรี โดยใช้ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สูตรผง อัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถคงอยู่บนต้นมะลิได้ประมาณ 1-2 วัน โดยมีอัตราการอยู่รอดประมาณ 25.36-71.69% การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สูตรผงควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิในแปลงเกษตรกรที่จังหวัดชลบุรีพบว่า กรรมวิธีพ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตรและกรรมวิธีพ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร มีประสิทธภาพในการควบคุมหนอนเจาะดอกมะลิได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่น

ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมด้วงหมัดผัก

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว ที่จังหวัดนนทบุรี

ผลการทดลองปี2557 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สูตรผงควบคุมด้วงหมัดผักในแปลงผักกาดหัวที่จังหวัดนนทบุรี พบแปลงที่ทำการพ่นไส้เดือนฝอยสูตรผงอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร แปลงพ่นไส้เดือยฝอยชนิดบรรจุในชิ้นฟองน้ำอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร แปลงพ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร และแปลงพ่นสารฆ่าแมลง fipronil 5% sc อัตรา 40 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร มีจำนวนหัวผักกาดที่ไม่มีการทำลายของตัวอ่อนด้วงหมักผักไม่แตกต่างกัน และมากกว่า แปลงที่พ่นแปลงพ่นไส้เดือยฝอยชนิดบรรจุในชิ้นฟองน้ำอัตรา 20 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตรและแปลงที่ไม่ควบคุมศัตรูพืช

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเจาะดอกมะลิเนื่องจากไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อัตราต่างๆ

	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเจาะดอกมะลิ(%)	
	หลังทำการทดลอง24ชั่วโมง	หลังทำการทดลอง48ชั่วโมง
ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* 500 ตัว/มล.	71.67	100
ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* 1000 ตัว/มล.	100	100
ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* 2000 ตัว/มล.	100	100
ไม่ใช้ไส้เดือนฝอย	0	0

ตารางที่ 2 อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* บนช่อดอกมะลิหลังพ่นทดลอง

	จำนวนไส้เดือนฝอย/ช่อดอก (ตัว)	อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย (%)
หลังพ่น	20.83	100
หลังพ่น 24 ชั่วโมง	14.1	67.69
หลังพ่น 48 ชั่วโมง	5.7	27.36
หลังพ่น่ 72 ชั่วโมง	1.4	6.72
หลังพ่น 96 ชั่วโมง	0	0

ตารางที่ 3 น้ำหนักของผักกาดหัวในแต่ละกรรมวิธี

กรรมวิธี	น้ำหนักผลผลิตผักกาดหัว (กก./10 ตารางเมตร)
พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 20 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร	60
พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร	80
พ่นไส้เดือยฝอยชนิดบรรจุในชิ้นฟองน้ำอัตรา 40 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร	83
พ่นไส้เดือยฝอยสูตรผงอัตรา 50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร	72
พ่นด้วยสารฆ่าแมลง fipronil 5% sc อัตรา 40 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร	82
ไม่ควบคุมศัตรูพืช	59

การทดลองที่ 2.4.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ชนิดผง

ผลการทดลอง

หลังการผสมสารไคโตซาน และ กัม อัตรา 0.1 และ 0.05% ในผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยผง พบว่าภายในเวลา 1 ชั่วโมง ไคโตซาน และ กัม ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอย และเมื่อนำไส้เดือนฝอยนี้ไปทดสอบคุณภาพตามวิธีมาตรฐานของ Miller (1989) โดยนำสารแขวนลอยของไส้เดือนฝอย 1 ตัว หยดลงบนกระดาษกรองในถาดหลุม ขนาด 24 หลุมต่อถาด ก่อนใส่หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ไส้เดือนฝอยนี้ยังคงมีคุณภาพสามารถเข้าทำลายแมลงได้ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน และที่เวลา 3 เดือน ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในระดับสูง และยังคงมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลง

ทดสอบขนาดบรรจุ ต่างๆ ต่อความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง โดยศึกษาขนาดบรรจุไส้เดือนฝอยชนิดผง 4 ระดับ ได้แก่ 10, 15, 20 และ 25 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทุก 2 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างไส้เดือนฝอยจำนวน 1 กรัมนำมาละลายน้ำและตรวจการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller 1989 พบว่า ขนาดบรรจุไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง ที่อัตรา 15 และ 20 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดสูงกว่ากรรมวิธีอื่น

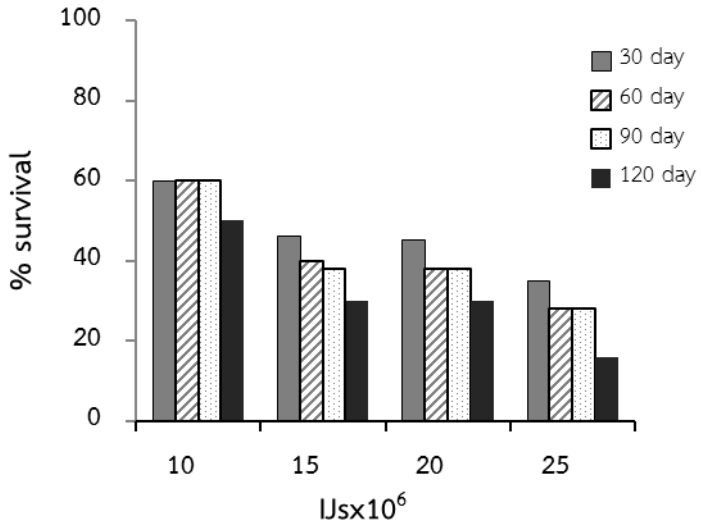
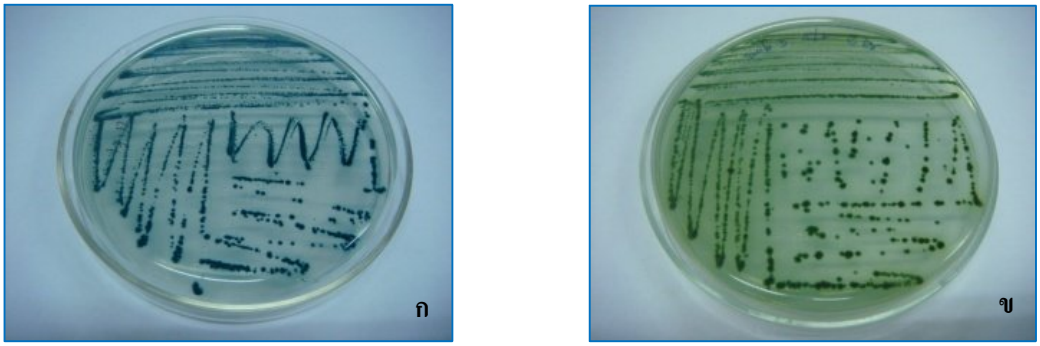


Figure 1 Survival percentage of entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* maintained in powder formulation at 5-7 ^{0}c.

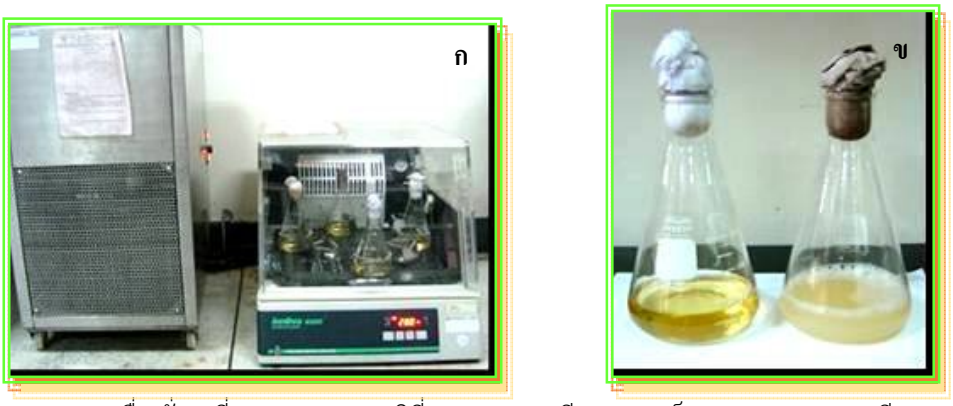
การทดลองที่ 2.4.6 เทคนิคการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

ผลการดำเนินงาน

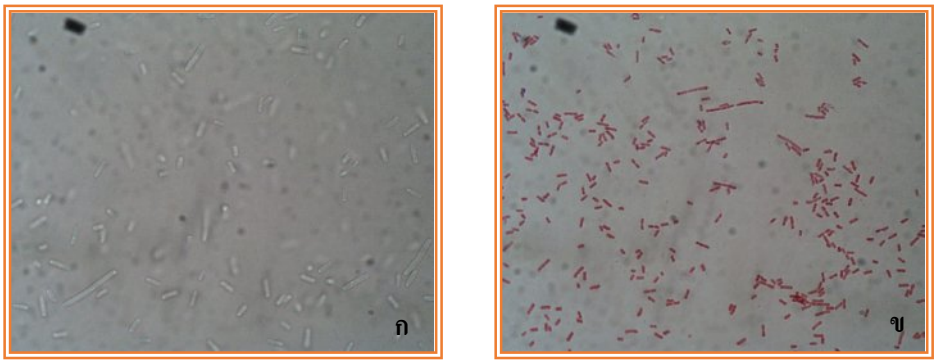
สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* ได้แก่ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* และ *Heterorhabditis indica* ได้แก่ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA โดยโคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีน้ำเงินเข้มตรงกลาง และขอบโคโลนีไม่เรียบ มีสีอ่อน ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า clear zone สำหรับโคโลนีของแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จะมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีเขียวเข้มตรงกลาง และขอบไม่เรียบมีสีอ่อน จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ทดลองนำลงเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth (แยกขวด) ทำการตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธี slide smear ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น สามารถนำเก็บในสารละลายกลีเซอรีนตามระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้ แต่เนื่องจากมีอุปสรรคในงานทดลอง เนื่องจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80°ซ ชำรุด และไม่สามารถจัดหาเครื่องใหม่มาใช้ทดแทนได้ ทำให้ต้องทดลองด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20°ซ แต่ผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งพบว่า แบคทีเรียมีสภาพไม่คงที่ ซึ่งก่อนทำการเก็บรักษามีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 10^7 เซลล์/มล. หลังการเก็บรักษาจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 10^2 - 10^3 เซลล์/มล. ดังนั้นจึงไม่สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -20°ซ ได้



ภาพ ก โคโลนีแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA
ภาพ ข โคโลนีแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA

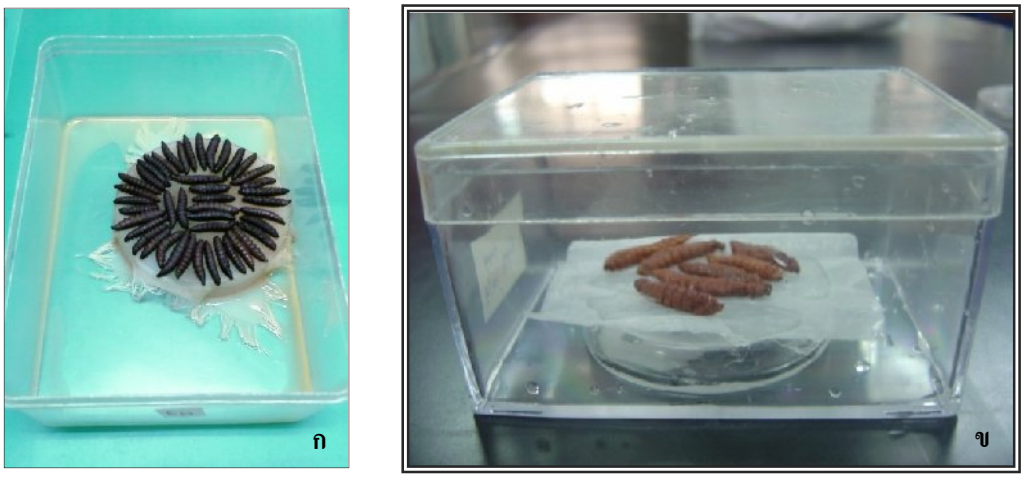


ภาพ ก เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที
ภาพ ข อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YS Broth (ซ้าย) และ แบคทีเรียในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (ขวา)



ภาพ ก เซลล์แบคทีเรียร่วมอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
ภาพ ข เซลล์แบคทีเรียร่วมอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากการย้อมแกรม

สำหรับการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยด้วยหนอนกินรังผึ้ง พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิด สามารถเพาะเลี้ยงขยายได้เป็นปริมาณมากด้วยหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*



ภาพแสดงลักษณะหนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดเข้าทำลาย
ภาพ ก หนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* ทำลาย
ภาพ ข หนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* ทำลาย

สำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด พบปัญหาเกี่ยวกับเครื่องมือที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง และไม่สามารถดำเนินการทดสอบได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีการตัดลดงบประมาณในการดำเนินงาน ทำให้ไม่สามารถดำเนินงานตามที่ได้วางแผนการดำเนินงานไว้ จึงทำได้เพียงการเพาะเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ให้ได้เป็นปริมาณมากเท่านั้น

โดยทั่วไปแล้วการเก็บรักษาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตให้อยู่ได้อย่างมีชีวิตเป็นระยะเวลายาวนานคือการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า –130°ซ (White and Wharton, 1984) และวิธีการ Cryopreservation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เพื่อการรักษาสภาพเนื้อเยื่อ และองค์ประกอบสำคัญของการมีชีวิต อีกทั้งอุณหภูมิที่คงที่ตลอดเวลาควบคุมการเก็บรักษามีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้การควบคุมอัตราการละลายขณะนำสิ่งมีชีวิตออกจากการควบคุมอุณหภูมิก็คงความสำคัญเช่นกัน (Triantaphyllou and McCabe, 1989) รายงานของ Popiel and Vasquez (1991) ศึกษาวิธีการ Cryopreservation สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายชนิด *Steinernema carpocapsae* และ *Heterorhabditis bacteriophora* ต่อมา Curran *et al* (1992) ทำการศึกษาเพิ่มเติมในกระบวนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าว

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้นเชื้ออย่างเฉพาะเจาะจง การเก็บรักษายังคงเก็บรักษาในรูปแบบเดียวกันกับการนำไปใช้ประโยชน์ คือเก็บในรูปของ suspension nematode ในชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ หรือเก็บรักษาแบบระยะสั้นๆ (Short-term) คือ เก็บในขวดพลาสติกเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 6-10°ซ ซึ่งระยะเวลาในการเก็บรักษาประมาณ 6-9 เดือน สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* แต่สำหรับไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* ระยะเวลาในการเก็บรักษาจะสั้นกว่าคือประมาณ 3-4 เดือน (Kaya and Stock, 1997) ในส่วนของแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้น การเก็บรักษาแบบระยะสั้นๆ จะเก็บรักษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA และเก็บที่อุณหภูมิ 12-25°ซ ซึ่งจำเป็นต้องทำการต่อเชื้อแบคทีเรีย ทุกๆ เดือน

กรณีเก็บที่ 12°ซ หรือ 2 ครั้งต่อเดือน เมื่อเก็บที่ 25°ซ (Kaya and Stock, 1997) สำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นระยะเวลานาน จำเป็นต้องเก็บรักษาแบคทีเรียเมื่อแบคทีเรียอยู่ในระยะ Phase I โดยการคัดเลือกโคโลนีและนำลงเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้การตรวจนับเซลล์และระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำเก็บรักษา มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

กิจกรรมย่อยที่ 2.1. การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.1.1 พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง

สรุปผลการทดลอง

เทคนิคการเพาะเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง จาก Embryonic stem cell จากหนอนแรกเกิด เปรียบเทียบ 4 ชนิด ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ต้นแบบได้ตามเทคนิควิธีการนี้ ที่สามารถนำไปเผยแพร่ได้ และถ้าวิจัยต่อเนื่องนำไปประยุกต์ต่อยอด จะได้เป็นต้นแบบที่เหมาะสมต่อการผลิตขยายไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงมาตรฐาน ที่สามารถนำไปจดสิทธิบัตร เพื่อเป็นประโยชน์ของกรมวิชาการเกษตรต่อไป นอกจากนี้ การตรวจวิเคราะห์คุณภาพไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ยืนยันผลไปในทิศทางเดียวกัน

การทดลองที่ 2.1.2 พัฒนารูปแบบการเก็บรักษาเซลล์แมลงเพาะเลี้ยงต้นแบบ

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีการทดสอบการเก็บรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง แบบระยะสั้น โดยการเก็บรักษาในภาชนะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆจะช่วยให้ลดค่าใช้จ่ายได้ ซึ่งถ้าได้ดำเนินการต่อเนื่อง และมีการตรวจสอบคุณภาพเซลล์ตามระยะการเก็บรักษา ด้วย เทคนิคชีวโมเลกุล หรือ วิธี isozyme analysis เพื่อยืนยันคุณภาพของเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น

การทดลองที่ 2.1.3การพัฒนารูปแบบชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูปเพื่อกำจัดหนอนกระทู้หอม

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนารูปแบบชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูป เพื่อพัฒนาชีวผลิตภัณฑ์ ในรูปผงละลายน้ำ พบว่า เชื้อสดไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม สามารถทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงสุดถึง 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชม. โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอน 80.95 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อสูงถึง 85.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผสมที่เหมาะสมในการผลิตชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปส่วนผสมชีวผลิตภัณฑ์ประกอบด้วยปริมาณหางนมร้อยละ 35-36, ปริมาณ Kaolin ร้อยละ 29-30 และปริมาณ Surfactant ร้อยละ 48-50 เมื่อนำชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชีวผลิตภัณฑ์มาตรฐานของกรมวิชาการเกษตรไวรัส เอ็นพีวี DOA BIO v1 โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเฉลี่ย 98.0 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การผลิตไวรัส เอ็นพีวี ชนิดผงในการทดลองนี้ ผลิตในลักษณะทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อนธรรมดา (Hot air oven) ที่อุณหูมิ 50^0 C โดยไม่ได้ผ่านขบวนการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer) ที่เคยผลิตอยู่เดิม ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้อย่างมาก เพราะการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะมีต้นทุนที่สูงมาก และเครื่องมือมีราคาค่อนข้างสูง ชีวภัณฑ์ที่ได้ยังมีชีวิตรอดอยู่ได้และสามารถกำจัดแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน ทำให้การผลิตชีวภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดผง มีต้นทุนลดลงต่ำกว่าเดิม ช่วยเพิ่มโอกาสให้เกษตรกรนำไปใช้เพิ่มมากขึ้น

การทดลองที่ 2.1.4 การเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ชนิดต่างๆด้วยเทคนิค Microencapsulation

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ทำให้เห็นลักษณะพื้นผิวของผลึกไวรัสที่ประกอบด้วยโปรตีนได้ละเอียดชัดเจน พบว่ามีลักษณะพื้นผิวเป็นร่องขรุขระเล็กๆ ซึ่งเป็นร่องที่เกิดจากการฝังตัวของ virions ในผลึกโปรตีน ซึ่งผลึกโปรตีนเหล่านี้มีหลายรูปแบบแต่ส่วนใหญ่จะพบเป็นรูปทรงกลม และมีขนาดที่แตกต่างกันไม่แน่นอน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.7-2.8 ไมครอน ไวรัสชนิดนี้เป็นชนิด multiple embedded มี virion ซึ่งหมายถึง อนุภาคไวรัส (nucleocapsid) ที่มีผนังล้อมรอบ ในแต่ละ virion อาจพบอนุภาคไวรัสได้ตั้งแต่ 1 ถึง 6 อนุภาค เมื่อทำการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมด้วยสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Starch-encapsulation พบว่าเกิดฟิล์มบางๆล้อมรอบอนุภาคไวรัสในทุกกรรมวิธีอย่างชัดเจนเมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน และผลจากการนำไปทดสอบด้วยการผ่านรังสียูวี ชนิดบี ที่เวลาต่างๆ พบว่าสาร Titanium dioxide และ Congo red มีความสามารถในการป้องกันแสงยูวีให้กับอนุภาคไวรัสเอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมได้ดีที่สุด ช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้ไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวี ชนิดบีนานถึง 24 ชม.

การทดลองที่ 2.1.5 ศึกษาชีววิทยาของโปรโตซัวที่เข้าทำลายระบบการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัสNucleopolyhedrovirus และการควบคุม

สรุปผลการทดลอง

การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเหมาะสม และวิธี sucrose gradient centrifugation สามารถทำให้เชื้อโปรโตซัวบริสุทธิ์ได้ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11 x 10^7 PIBs/ml แต่การปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด เหมาะกับการนำไปใช้งานต่อไป

การศึกษาผลของเชื้อโปรโตซัวต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 1 ไม่สามารถทำการทดลองได้เนื่องจากหนอนมีขนาดเล็ก อ่อนแอ และตายได้ง่าย ทำการทดลองหนอนกระทู้ผักวัย 2 3 4 และ 5 ที่ปริมาณเชื้อโปรโตซัวความเข้มข้นต่างๆ มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตในระยะหนอน ไม่แตกต่างกันในแต่ละวัย และน้ำหนักดักแด้ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกับในรุ่นลูก (F1)

จากการตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากมูลหนอนพบเชื้อโปรโตซัวในปริมาณน้อยมาก และหนอนที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับหนอนปกติ แต่ลำตัวจะมีสีซีดกว่าปกติ และควรทำการศึกษาผลของโปรโตซัวต่อหนอนในรุ่นต่อๆ ไป และศึกษาวิธีควบคุมเชื้อโปรโตซัวในการเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัสเอ็นพีวี

การทดลองที่ 2.1.6 การใช้สูตรผสมไวรัส NPV ร่วมกับแบคทีเรีย Bt ในการควบคุมหนอน ผีเสื้อศัตรูกุหลาบ

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนเจาะสมอฝ้ายวัยที่ 3 พบว่า หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุด คือ สูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส HaNPV ที่อัตรา 80+30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รองลงมาคือ สูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส HaNPV ที่อัตรา 80+40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีเปอร์เซนต์การตายของหนอน 90 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุด คือ สูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส HaNPV ที่อัตรา 80+30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รองลงมาคือ สูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส HaNPV ที่อัตรา 40+20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีเปอร์เซนต์การตายของหนอน 100 และ 97.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน พบว่าในสูตรผสมของเชื้อ Bt และไวรัส HaNPV ทุกอัตรา สามารถฆ่าหนอนตายได้ 95-100 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองประสิทธิภาพของสูตรผสมเชื้อแบคทีเรีย Bt และไวรัสหนอนกระทู้ผัก SlNPV พบว่า หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุด คือสูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส SlNPV ที่อัตรา 80+30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รองลงมาคือ สูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส SlNPV ที่อัตรา 80+20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีเปอร์เซนต์การตายของหนอน 17.50 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 5 วัน กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุด คือสูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส SlNPV ที่อัตรา 80+30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รองลงมาคือสูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส SlNPV ที่อัตรา 80+20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีเปอร์เซนต์การตายของหนอน 35.00 และ 25.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และหลังจากหนอนได้รับเชื้อเป็นเวลา 7 วัน กรรมวิธีที่ทำให้หนอนตายมากที่สุด คือสูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส SlNPV ที่อัตรา 80+30 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร รองลงมาคือสูตรผสมเชื้อ Bt และไวรัส SlNPV ที่อัตรา 40+50 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร โดยมีเปอร์เซนต์การตายของหนอน 57.50 และ 42.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพการใช้เชื้อ Bt ร่วมกับไวรัส SlNPV ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในแปลงกุหลาบ พบว่าวิธีการใช้เชื้อ Bt อัตรา 80 มิลลิลิตร ผสมกับ SlNPV อัตรา 30 มิลลิลิตร ให้ผลในการควบคุมหนอนกระทู้ผักได้ดีใกล้เคียงกับการใช้ไวรัส SlNPV อัตรา 50 มิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการนำ Bt ไปผสมกับ SlNPV จะช่วยเพิ่มความมั่นใจให้แก่เกษตรกรผู้ใช้โดย Bt จะให้ผลทำลายหนอนขนาดเล็กให้ตายในระยะ 2-3 วัน หลังจากนั้น SlNPV จะทำลายหนอนในระยะตัวโต ตายในระยะเวลา 5 – 8 วัน ถ้าเกษตรนำไปใช้ในแปลงกุหลาบในรูปแบบของการป้องกันมากกว่าการกำจัด โดยทำการพ่น Bt ผสม SlNPV ทุก 7 วัน สามารถควบคุมความเสียหายของดอกกุหลาบจากหนอนกระทู้ผักได้

กิจกรรมที่ย่อย 2.2. การผลิตและการใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตด้วยวิธีต่างๆ

สรุปผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรีย บีที *Bacillus thuringiensis* ที่ผลิตแบบชนิดอาหารเหลว (submerged culture) และชนิดอาหารแข็ง (solid state fermentation) ด้วยอาหารชนิดต่างๆ พบว่ามีผลผลิตของเชื้อและประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียบีทีมาตรฐาน ที่จำหน่ายเป็นการค้า ดังนั้นการนำเชื้อไปเพาะขยายต่อไว้ใช้เองอาจไม่คุ้มค่าการลงทุน แต่อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์ได้

การทดลองที่ 2.2.2 การศึกษาผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อประสิทธิภาพของแบคทีเรีย*Bacillus thuringiensis* และไวรัส NPV

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อการการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย Bt พบว่า สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่นำมาทดลองส่วนใหญ่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ Bt น้อยมาก แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้จนถึงชั่วโมงที่ 5 สารป้องกันกำจัดไรศัตรูพืช pyridaben จะมีผลทำให้ปริมาณเชื้อ Bta ลดลงมากที่สุด และจากการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอม พบว่าเมื่อนำเชื้อ Bta มาผสมกับ สารป้องกันกำจัดโรคพืช carbendazim, chlorothalonil และ difenoconazole จะทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมลดลง และเชื้อ Btk ที่ผสมกับ สารป้องกันกำจัดโรคพืช chlorothalonil และ difenoconazole จะทำให้ประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมลดลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงที่จะผสมสารดังกล่าวกับเชื้อ Bt ที่จะใช้ในสภาพไร่เพื่อทำการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม และจากการศึกษาผลของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อประสิทธิภาพไวรัส NPV พบว่าสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ทุกชนิดไม่มีผลต่อประสิทธิภาพไวรัส NPV

การทดลองที่ 2.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ไอโซเลทต่างๆ ในการควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืช

สรุปผลการทดลอง

การฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bt* ไอโซเลท DOA45026046, DOA45030011, DOA45096002, DOA45558017, DOA45647002 ไอโซเลท และ *Bt* isolate aizawai *Bt* isolate kurstaki และ Tolfenpyred พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกรรมวิธี แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับแปลงควบคุม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณหนอนใยผักเฉลี่ยที่พบ ข้อมูลการวิเคราะห์ผลทางสถิติ และน้ำหนักผลผลิต จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bt* ไอโซเลท DOA45096002 ซึ่งสามารถลดปริมาณหนอนใยผักทำให้พบหนอนใยผักน้อยที่สุดโดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกครั้งที่ทำการฉีดพ่น เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณและใช้ในการฉีดพ่นกำจัดหนอนใยผักต่อไป

การทดลองที่ 2.2.4 การศึกษาการพัฒนาความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของหนอนกระทู้หอม

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบความต้านทานต่อเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (Bta) และ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk) ของหนอนกระทู้หอมที่เก็บมาเลี้ยงขยายจากจังหวัดกาญจนบุรี พบว่า หนอนกระทู้หอมในรุ่น F2, F3 และ F4 มีความทนทานต่อเชื้อ Bta ซึ่งมีค่าอัตราความต้านทานอยู่ระหว่าง 0.77 – 1.51 เท่า และ หนอนกระทู้หอมในรุ่น F2, F3 และ F4 มีความทนทานต่อเชื้อ Btk ซึ่งมีค่าอัตราความต้านทานอยู่ระหว่าง 0.08 – 2.27 เท่า ซึ่งแสดงว่าหนอนกระทู้หอมไม่ต้านทานต่อเชื้อ Bt ดังนั้นยังสามารถใช้เชื้อ Bt ในการควบคุมหนอนกระทู้หอมได้ แต่ต้องใช้อัตราตามคำแนะนำและมีการพ่นที่ถูกวิธี เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุม

กิจกรรมที่ย่อย 2.3. การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.3.1 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรีย; *Beauveria bassiana* (Balsamo) เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราบิวเวอเรียทั้ง 4 ไอโซเลทในห้องปฏิบัติการพบว่า เชื้อราบิวเวอเรียทั้ง 4 ไอโซเลทมีแนวโน้มในการใช้ควบคุมเพลี้ยแป้งสีชมพู ได้ดีกว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม โดยพบว่าเชื้อราบิวเวอเรียสายพันธุ์ชุมพร (B4) ทำให้เพลี้ยแป้งสีชมพูติดเชื้อได้ 96 – 100% ในขณะที่ผลการทดสอบประสิทธิภาพกับเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลพบการติดเชื้ออยู่ระหว่าง 3.75 – 12.5% และผลการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม สามารถทำให้ติดเชื้อเพียง 2%

การศึกษาวิธีการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร

เชื้อราบิวเวอเรีย *B. bassiana* (Balsamo) สายพันธุ์ชุมพร สามารถเจริญเติบโตและสร้างโคนิเดียได้ดีบนข้าวโพดบดหยาบ 50 กรัม ต่อปริมาณน้ำ 50 มล. (อัตราส่วน 1: 1) โดยไม่มีความจำเป็นต้องใส่โมลาสหรือยูเรียเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต หรือสร้างโคนิเดีย

การทดลองที่ 2.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียวเมตาไรเซียม; *Metarhizium anisopliae*(Metsch) Sorokin เพื่อป้องกันกำจัดด้วงหมัดผัก; *Phyllotreta sinuata* Stephens)

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพราเขียวเมตาไรเซียมทั้ง 10 ไอโซเลทได้แก่ M0, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8 และM9 กับด้วงหมัดผักในห้องปฏิบัติการ พบว่าราเขียวเมตาไรเซียมไอโซเลท M3, M5, M7, M8, M2, M9, M1, M0 และ M6 มีประสิทธิภาพทำให้ด้วงหมัดผักติดเชื้อราเขียวได้ดีไม่แตกต่างกันในทางสถิติ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เฉลี่ย 100, 100, 100, 97.50, 95, 91.25, 90, 88.75 และ 85% ตามลำดับ แต่เมื่อเลือกไอโซเลท M3 ไปขยายผลทดสอบต่อในสภาพไร่กลับให้ผลที่แตกต่างจากห้องปฏิบัติการ โดยไอโซเลท M3 ไม่สามารถควบคุมปริมาณประชากรด้วงหมัดผักในสภาพไร่ได้ ซึ่งอาจจะเกิดจากระยะเวลาและเทคนิคการใช้ที่ไม่เหมาะสม ในอนาคตน่าจะได้มีการทดลองซ้ำ ซึ่งอาจจะเพิ่มระยะเวลาในการทดลอง และเพิ่มอัตราการใช้ราเขียวเมตาไรเซียมให้มากขึ้น รวมทั้งการเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้เชื้อราชนิดนี้

การทดลองที่ 2.3.4 ประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดในการควบคุมแมลงหวี่ขาว (white fly)

สรุปผลการทดลอง

การส่งตัวอย่างเชื้อราไปจำแนกชนิดที่ศูนย์พันธุวิศวกรรม ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพิ่ม 2 สายพันธุ์ คือ *Paecilomyces lilacinus* และ *Isaria javanica* ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *M. anisopliae, B. bassiana, P. lilacinus* และ *I. javanica* กับแมลงหวี่ขาวยาสูบ: *Bemisia tabaci* Gennadius พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 4 ชนิด สามารถทำให้แมลงหวี่ขาวมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อใกล้เคียงกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ เปอร์เซ็นต์แมลงหวี่ขาวที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงส่วนใหญ่จะเริ่มพบหลังทดสอบเชื้อวันที่ 3 และ 4

กิจกรรมย่อยที่ 2.4. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

การทดลองที่ 2.4.1เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema riobrave*

สรุปผลการทดลอง.

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ด้วยแมลงอาศัยหนอนกินรังผึ้ง *Galleria melonella* โดยวิธี paper bioassay โดยใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นตั้งแต่ 2,000 – 4,000 ตัวต่อน้ำ 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ออกลูกหลานและพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) และเริ่มออกจากซากหนอนวันที่ 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 210,000 – 360,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในทุกกรรวิธีมีคุณภาพและมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อทดสอบตามวิธีการของ Miller (1989) โดยหยดไส้เดือนฝอย 1 ตัว ต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ตรวจผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง แม้ว่าการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยหนอนกินรังผึ้ง *G. melonella* จะให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงถึง 360,000 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารและจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นที่ใช้ซึ่งอาจมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงที่ผลิตได้ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการพัฒนารูปแบบและวิธีการผลิตอื่นที่เหมาะสมทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากเพียงพอสำหรับความต้องการของเกษตรกรในการนำไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ รูปแบบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงในวัสดุอุ้มความชื้น 3 ชนิด ที่ทำการศึกษา พบว่า การเก็บไส้เดือนฝอยในโพลิเมอร์ และฟองน้ำสังเคราะห์ ในถุงพลาสติก ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีชีวิตรอดได้สูงกว่าการเก็บในผงดินในถุงพลาสติก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 และ 25 องศาเซลเซียส

การทดลองที่ 2.4.2 ศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ในการควบคุมด้วงหมัดผักแถบลาย *Phyllotreta sinuata* (Stephens)

สรุปผลการทดลอง

ในสภาพห้องปฏิบัติการ ไส้เดือนฝอย S. riobrave อัตรา 20,000 ตัว มีประสิทธิภาพสามารถทำให้ด้วงหมัดผักตัวเต็มวัยตายได้โดยใช้เวลาตั้งแต่เวลา 2-5 วัน ซึ่งทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงสุด 80 เปอร์เซ็นต์ (ที่ 5 วัน) และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไส้เดือนฝอย S. riobrave มีประสิทธิภาพเข้าทำให้ด้วงหมัดผักตายสูงกว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ต้องทำการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย S. riobrave ในการเข้าทำลายด้วงหมัดผักระยะอื่นซึ่งอาศัยอยู่ในดิน และควรมีการทดสอบเพื่อขยายผลในสภาพแปลงทดลองด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้นและเพื่อเป็นข้อมูลในการส่งเสริมและแนะนำเกษตรกรในการนำไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมด้วงหมัดผักในพืชผักตระกูลกะหล่ำต่อไป

การทดลองที่ 2.4.3 วิจัยและพัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

สรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* ด้วยหนอนกินรังผึ้ง โดยใช้ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอย *Steinernema glaseri* 2,000 ตัว/น้ำ 0.4 มล.ตัว ตัวต่อหนอน 10 ตัว ในสภาพอุณหภูมิห้อง จะได้ปริมาณไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ระยะเข้าทำลายแมลง(IJ) มากที่สุด

การเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว สามารถเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ให้ได้ปริมาณมากได้โดย ใช้สูตรอาหารอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวที่ประกอบด้วยอาหารสุนัข น้ำมันหมู หนอนกินรังผึ้ง และน้ำใส่ไส้เดือนฝอย IJ จำนวน 5000 ตัว/flask เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วัน จะได้ปริมาณไส้เดือนฝอย *S. glaseri* ระยะเข้าทำลายแมลง(IJ) มากที่สุด

การทดลองที่ 2.4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

สรุปผลการทดลอง

การใช้ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผง ในอัตรา 40-50 ล้านตัวต่อน้ำ 20 ลิตร สามารถใช้พ่นทุก 3-4 วัน สามารถลดการระบาดของหนอนเจาะดอกมะลิลงได้ และการพ่นไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผง เมื่อผักกาดหัวอายุ 0, 10, 20 และ 30 วัน สามารถลดความเสียหายของหัวผักกาดจากการทำลายของตัวอ่อนด้วงหมัดผักได้

การทดลองที่ 2.4.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ชนิดผง

สรุปผลการทดลอง

การผสมสารไคโตซาน และ กัม อัตรา 0.1 และ 0.05% ในผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยผง ไคโตซาน และกัม ไม่มีผลต่อการมีชีวิตและคุณภาพของไส้เดือนฝอย เป็นเวลา 3 เดือน ไส้เดือนฝอยยังคงมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในระดับสูง และยังคงมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงสูงเช่นเดิม

ศึกษาขนาดบรรจุต่อความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง ที่อัตรา 15 และ 20 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดสูงที่สุด

การทดลองที่ 2.4.6 เทคนิคการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

สรุปผลการทดลอง

ผลการดำเนินงานสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จาก *Heterorhabditis indica* ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA โดยปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นสามารถนำไปใช้ศึกษาต่อในเรื่องของการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ หรืองานทดสอบด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อไป

จากปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงาน จึงไม่สามารถทราบผลการเก็บรักษาแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ ดังนั้นถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานาน และมีความแข็งแรงเมื่อนำออกมาใช้ประโยชน์เพื่อให้สามารถคงประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างสูงสุด โดยที่รูปแบบวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้นเชื้อ และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่นำไปใช้ประโยชน์กำจัดแมลงศัตรูพืชจะมีรูปแบบที่แตกต่างกัน คือ การเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อรักษาชนิดพันธุ์ หรือเพื่อนำไปเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่อนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงระยะเวลาการมีชีวิตรอด การคงสภาพ และความสามารถในการพัฒนาการเจริญเติบโตได้หลังการเก็บรักษา ส่วนการเก็บรักษาผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหลังจากผ่านการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ คุณภาพและประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อนำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช อายุการเก็บรักษาในวัสดุภัณฑ์ที่เหมาะสม ความสะดวกในการเก็บรักษาและการขนส่ง และต้องง่ายและเหมาะสมเมื่อนำไปใช้ฉีดพ่นในสภาพไร่นา

กิจกรรมที่ 3 การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช
Mass Production and Utilization of Microorganism for Control Plant Pathology

ผู้วิจัย

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1] บูรณี พั่ววงษ์แพทย์[1] บุษราคัม อุดมศักดิ์[1] ธารทิพย ภาสบุตร[1] ทัศนาพร ทัศคร[1]
รุ่งนภา คงสุวรรณ[1] พีระวรรณ พัฒนวิภาส[1] รุ่งนภา ทองเครั่ง[1] ทิพวรรณ กัณหาญาติ[1] ไตรเดช ข่ายทอง[1]
สุรีย์พร บัวอาจ[1] ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี[1] อภิรัชต์ สมฤทธิ์[1] ฐิติยา สารพัฒน์[1] อมรรัตน์ ภู่ไพบูลย์[1]
รุ่งนภา คงสุวรรณ์[1] วัชรี วิทยวรรณกุล[1] มนตรี เอี่ยมวิมังสา[1] ชนินทร ดวงสอาด[1]
สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ[1] พรพิมล อธิปัญญาคม[1]
ศิวิไล ลาภบรรจบ[2] อ้อยทิน จันทร์เมือง[3] วราภรณ์ บุญเกิด[4] สุทธินี ลิขิตตระกูลรุ่ง5
กรกช จันทร[6] ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์[6]

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช[1]
ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่[2]
ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชไร่[3]
ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์[4]
สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1[5]
สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ[6]

คำสำคัญ(key word)

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี *Bacillus subtilis* โรคเหี่ยว มันฝรั่ง ขิง *Alternaria brassicicola Phytophthora parasitica* โรคเน่าเละกล้วยไม้ *Erwinia carotovora Rhizoctonia solani* โรคแอนแทรคโนสพริก *Colletrotrichum gloeosporioides Colletotrichum capsici* โรคเหี่ยวเขียว *Fusarium solani Didymella bryoniae* โรคยางไหล *Burkholderia gladioli* โรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้โรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ โรคเน่าเละ แบคทีเรียปฏิปักษ์ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โรคใบจุด ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp ไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus* spp โรคโคนเน่า เชื้อราเอนโดไฟท์ *Sclerotium rolfsi Fusarium oxysporum* โรคใบจุดคะน้า *Alternaria brassicicola Trichoderma harzianum Oudemansiella* spp. *Alternaria* spp โรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า

บทคัดย่อ (Abstracts)

กิจกรรมการผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็น antagonist มาใช้ควบคุมโรคพืช ทั้งที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรีย ช่วยลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้องเหมาะสม โดยครอบคลุมการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืช ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืช และการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ดำเนินการระหว่างระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2558 โดยมีการทดลองทั้งสิ้น 24 การทดลอง เป็นการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช 3 การทดลอง การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus spp* ในการควบคุมโรคพืช 7 การทดลอง การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช 5 การทดลอง การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช 2 การทดลอง และการผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช 7 การทดลอง ดำเนินการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงเกษตรกร การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช พบว่า การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ได้ผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปริมาณแบคทีเรีย $4.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม โดยสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ได้นาน 12 เดือน และเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ได้นาน 15 เดือน การผลิตภัณฑ์ *Bacillus. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 แบบเม็ด โดยใช้ เกาลินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร มีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ที่ 10^9 cfu/g ชีวภัณฑ์นี้เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* (Bs) สูตรผง เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยการทดสอบสารพาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาปริมาณ Bs พบว่า ถ้าทำการผสมปรุงแต่งแล้วนำไปใช้ทันที พบว่าการใช้ซีโอไลท์เป็นสารพามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงสุด ส่วนการใช้สารทัลคัมเป็นสารพามีความเหมาะสมในการผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus spp* ในการควบคุมโรคพืช พบว่า ศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus ไอโซเลท GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 22W11 มีศักยภาพในการลดการเกิดโรคเน่าดำของหน้าวัวในระดับโรงเรือน ได้ประมาณ 15 % ศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus ไอโซเลท 20W32 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเน่าดำบนต้นสับประรดในโรงเรือน ค่าเฉลี่ยของพื้นที่แผลโรคเท่ากับ 0.534 ตร.ซม. แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 สามารถควบคุมการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Erwinia carotovora subsp. carotovora และ E. chrysanthemi สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ถึง 85 – 95 เปอร์เซ็นต์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W33 และ 20W16 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของพริก สาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* เชื้อ *B. subtilis* BS1 ไอโซเลท(17G18) มีศักยภาพที่ดีในการเป็นตัวเลือกในการยับยั้งหรือลดจำนวนต้นเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวา แตงโม และมะระ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. solani* การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช พบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS32, BSS37, BSS65 และ AS013 มีศักยภาพที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ ในการป้องกันกำจัดโรคยางไหลของแตงโดยชีววิธี เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS5 BS23 และ BS40 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในเรือนทดลองได้ดี ส่วน*Bacillus subtilis* ไอ

โซเลท BVB-2, BVS-43 และ BVR-37 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาล ในระดับโรงเรือนปลูกพืชทดลอง การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. penetrans* จากหัวมันฝรั่ง มันขี้หนูและรากพริกบางไอโซเลตสามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ ส่วนการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช พบว่ายังไม่พบเชื้อราที่มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืชได้มากนัก

บทนำ (Introduction)

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

แบคทีเรีย *R. solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยวที่ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ตั้งแต่พืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ *Solanaceae* (Hayward, 1964) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่แบคทีเรียเข้าทำลาย สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียสาเหตุโรคนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศ ได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรีย จนกระทั่งผลิตรูปแบบผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลายเช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นต้น

แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ มีอยู่มากมายทั้งในดิน ตามผิวพืชและแหล่งอาหารที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและสามารถแยกได้ง่าย และเจริญได้รวดเร็วที่บริเวณรากพืช นอกจากนี้แบคทีเรีย *B. subtilis* ยังมีความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนและสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (Baker and Cook, 1974) มีรายงานการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ Celino and Gotllieb (1952) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* B_3 A ใส่ลงในดินที่มีแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้และลดการเกิดโรคจาก 70 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ Aspiras and de la Cruz (1985) ได้รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* FU 6 และ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ และมันฝรั่ง เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญที่บริเวณรากของต้นกล้าได้ดี และสามารถป้องกันการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ Karuna *et al.* (1997) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแบบชีววิธี ได้แก่ *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าแบคทีเรีย *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *B. subtilis* เมื่อนำไปใช้ในเรือนทดลอง พบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศที่เจริญเติบโตในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ดี Sanaina *et al.* (1997) ศึกษาแบคทีเรียจากบริเวณรากของต้นมันฝรั่งโดยแยกแบคทีเรียจากรากของต้นปกติและรากของต้นที่เป็นโรค นำมาคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus, B. subtilis* และ *Enterobacter*

cloaceae ที่แยกได้จากรากมันฝรั่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำการศึกษากับดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* 3 แห่งของประเทศอินเดีย คือ เมือง Bhowali Palampur และ Bhubaneswar สามารถลดการเกิดโรคได้ 66-83 เปอร์เซ็นต์, 27-70 เปอร์เซ็นต์ และ 24-71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าที่เมือง Bhowali และ Bhubaneswar มีผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 160 เปอร์เซ็นต์ Guo *et al.* (2002) รายงานการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกโดยชีววิธี โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* สายพันธุ์ J3, แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ BB11 และ FH17 ที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้ต้นพริก (Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria) สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ 30 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ J3 และ BH11 สามารถทำให้โรคลดลง 54 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ FH17 สามารถทำให้โรคลดลง 34 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาผสมกันในอัตรา 1:1:1 พบว่าสามารถทำให้โรคลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 200 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้เป็นการต่อยอดงานวิจัยของวงศ์ และคณะ (2548) ซึ่งได้ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรค และพบว่า *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สามารถป้องกันและควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงที่ใช้ง่ายและสะดวกในการนำไปใช้ควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่งในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร และศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ โดยมุ่งเน้นการศึกษา สูตรอาหารและปัจจัยที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* จากนั้นนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยว ในแปลงปลูกมันฝรั่ง รวมทั้งติดตามตรวจสอบการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียและอายุของผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ในสภาพต่างๆ และพัฒนาสูตรสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สำหรับนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพและสะดวกในระดับแปลงปลูก

คะน้า (*Brassica alboglabra*) เป็นผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมปลูกและบริโภคทั้งในประเทศและเป็นสินค้าส่งออกไปต่างประเทศ คะน้าอุดมด้วยธาตุอาหารและวิตามิน โดยเฉพาะเบต้า-แคโรทีนและแคลเซี่ยม (กรมอนามัย, 2535) คะน้าสามารถปลูกได้เกือบทุกพื้นที่ในประเทศไทย โดยในช่วงปี 2548/2549 พบว่า ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกคะน้า 48,731 ไร่ ให้ผลผลิต 58,019.86 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2549) แต่ประเทศไทยมักประสบปัญหาการส่งออกพืชผักรวมทั้งคะน้า เนื่องจากมักตรวจพบสารเคมีตกค้างในผักเกินกว่าค่าที่กำหนด ซึ่งปัญหาหลักของการปลูกคะน้าคือโรคและแมลงศัตรู โดยโรคพืชที่สำคัญคือ โรคใบจุดซึ่งเกิดจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire เป็นเชื้อราที่มักทำให้เกิดโรคกับพืชผักตระกูลผักกาด เช่น คะน้า ผักกาดขาว ผักกาดเขียว บร็อคโคลี กวางตุ้ง และกะหล่ำปลี เป็นต้น อาการของโรคเกิดทุกส่วนของพืช ทั้งใบ ก้านใบและลำต้น พบได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการในต้นแก่มักพบบนใบและก้าน เกิดเป็นแผลจุดเล็ก ๆ สีเหลือง ต่อมาแผลขยายใหญ่ขึ้น สีน้ำตาลเข้มถึงดำ แผลมีลักษณะเป็นวงค่อนข้างกลม เรียงซ้อนกันเป็นชั้น ๆ สปอร์ของเชื้อราแพร่ไปตามลม น้ำ แมลง สัตว์ มนุษย์ และติดไปกับเครื่องมือระบาดมากในฤดูฝนหรือสภาพที่มีความชื้นสูง (พรพิมล, 2552) โรคนี้พบได้ทุกแหล่งปลูกของคะน้า เชื้อราสามารถแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำความเสียหายต่อผลผลิต ทำให้ผลผลิตลดลงหรือด้อยคุณภาพ เกษตรกรจึงมักเลือกใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดเป็นอันดับแรก และมักใช้อย่างผิดวิธีจึงทำให้เกิดผลกระทบของการใช้สารเคมีดังกล่าว ในปัจจุบันการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะใน

ต่างประเทศมีการผลิตขายในเชิงพาณิชย์แล้ว เช่น *Bacillus subtilis* MBI 600 ; Integral ® หรือ *Bacillus subtilis* QST 713 ซึ่งผ่านการขึ้นทะเบียนจากสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา หรือ Environment Protection Agency ; EPA (WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm)

แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไป ในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ ฯลฯ เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลาย ของซากพืชและซากอื่นๆ สามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์จำพวก carbohydrase และ protease ออกนอกเซลล์ได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นแบคทีเรียประเภท aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอด ซึ่งสามารถอยู่รอดได้แม้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ความร้อนสูง ขาดแคลนอาหาร และแสงอุลตร้าไวโอเลต และเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม *B. subtilis* ก็สามารถงอกกลับเป็นเซลล์แบคทีเรียได้ใหม่โดยง่าย ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในสภาพธรรมชาติ (Baker and Cook, 1974) นอกจากนี้ *B. subtilis* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ยั้บยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคพืช (Fiddaman and Rossal, 1994) และไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ สัตว์ และไม่มีพิษตกค้างต่อสิ่งแวดล้อม (Shoda, 2000)

ในประเทศไทยก็ได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชกันมาอย่างต่อเนื่อง จนสามารถพัฒนาได้เป็นสารชีวินทรีย์หลายชนิดที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบได้กับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช แบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้เช่นเดียวกับ pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสงในพืชหลายชนิด ทั้งสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงทดลอง (นิพนธ์, 2538) พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลอง ใช้ข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48, 52.53, 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ซึ่งทุกกรรมวิธี จะมีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธี เปรียบเทียบอย่างนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคสูงถึง 65.46 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ณัฏฐิมาและคณะ (2548) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน, รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ประมาณ 70-100% วรรณวิไลและคณะ (2548) ได้ทดลองพ่น *Bacillus* sp. ไอโซเลท WS 16 และWS 18 ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าในแปลงปลูก พบว่า ทั้งสองไอโซเลท สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการพ่นด้วยน้ำนึ่ง ในปี พ.ศ. 2550 บุษราคัม และ ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4, 22W10, 20W12,17G18 และ 20W4 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวา 100% โดยไอโซเลท 17G18 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากทั้งเชื้อรา *F. oxysporum* และ *F. solani* ปฏิมาพรและคณะ (2551) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าโดยวิธี standard blotter plate พบว่าการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 41.90% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและ

โคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง โดยหลังเสร็จสิ้นการทดลอง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดอยู่บนผิวพืช และในดินรอบรากต้นพริกชี้ฟ้าได้

B. subtilis เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย จุลินทรีย์ชนิดนี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อนที่มีอยู่ในวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น กากเมล็ดฝ้าย และกากน้ำตาลได้ ส่วนเกลือแร่ต่างๆ มักต้องการในปริมาณน้อย การเติมเกลือแร่บางชนิด เช่น แคลเซียมและแมงกานิสจะเพิ่มอัตราการสร้างสปอร์ได้ โดยไวรุจน์ และคณะ (2550) ได้รายงานไว้ว่า ในการผลิตสปอร์ของ *B. subtilis* นั้น สามารถใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตได้ดี แต่อาจเกิดปัญหาเรื่องฟองในการผลิตระดับใหญ่ กากถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสม และบุษราคัมและณัฏฐิมา (2553) ได้รายงานไว้ว่า สูตรที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในขบวนการแปรรูป *B. subtilis* คือสูตร FFS1 ซึ่งเป็นส่วนผสมของ โปรตีนปลา (เศษปลาหมักหรือปุ๋ยปลา) 10 ม.ล. ผสมกากถั่วเหลือง 10 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 ม.ล.เนื่องจากส่วนผสมมีราคาถูก หาซื้อง่าย และใช้เวลาการเลี้ยงในระยะสั้นที่สุด และการเลี้ยงแบคทีเรีย ในสภาพเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการสร้างเอ็นโดสปอร์ของ *B. subtilis*

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรัตน์ และ มณจันทร์ (2539) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 *และ B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช ในหนูถีบจักรเพื่อยืนยันความปลอดภัยนี้ โดยได้ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียนี้ชนิดผง 2 ชนิด โดยผสมกับอาหารในอัตรา 1:10 โดยน้ำหนักซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำใช้ทาแผลบนต้นพืช ทำการทดสอบกับหนูถีบจักร ให้อาหารทางปากในอัตรา 10 กรัมต่อวันต่อตัวโดยเฉลี่ยเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้เกิดขึ้น

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus spp* ในการควบคุมโรคพืช

Phytophthora parasitica Dastur เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญ มีพืชอาศัยมากกว่า 200 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจได้ถึง 30 ชนิด เช่น โรคยอดเน่า (heart rot) รากเน่า (root rot) สับประรด โรครากเน่า (root rot) ใบไหม้ (leaf blight) ของส้มจุก ส้มจีน โรคใบร่วงยางพารา โรคโคนเน่ามะนาว โรคใบไหม้สะระแหน่ โรคเน่าดำกล้วยไม้ (พัฒนาและคณะ, 2537) และโรคเน่าดำ หรือใบแห้งของหน้าวัว การเข้าทำลายรวดเร็วและรุนแรง โดยลักษณะอาการที่พบเสมอ ได้แก่ อาการรากและโคนเน่า โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถอยู่รอดนอกฤดูในดินและในเศษซากพืชในลักษณะสปอร์ผนังหนาเป็นจำนวนมาก อาจอยู่ในดินได้นาน 4-6 ปี (อมรรัตน์,2552) การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคนี้จึงมักจะได้ผลในระยะแรก เนื่องจากเชื้อสามารถปรับตัวและเกิดการดื้อยาได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการศึกษาการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้เพื่อควบคุมเชื้อราชนิดนี้จึงน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถมาควบคุมโรคนี้ได้อย่างยั่งยืนได้ในอนาคต ซึ่งในปัจจุบันก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรคพืช เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีและสามารถพัฒนาเป็นการค้าได้หลายชนิด เช่น ในประเทศออสเตรเลียได้พัฒนาใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในทางการค้าสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium radiobecter* K84 ที่เป็นพวกซาโปรไฟท์ไปควบคุมโรคปุ่มปมของพืชที่เกิดจากเชื้อ *A. tumefaciens* แบคทีเรียแบคทีเรียกลุ่ม pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสง มีความสามารถในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียที่ติดไปกับดิน ซึ่งเป็นเชื้อโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชอย่างมาก หรือแบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้เช่นเดียวกับ pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสงในพืชหลาย

ชนิด ทั้งสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงทดลอง (นิพนธ์, 2538) *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไป ในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ ฯลฯ แบคทีเรียนี้สามารถหลั่งสารประกอบต่างๆ ที่สร้างขึ้นออกสู่ภายนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบคทีเรียนี้เพียงไม่กี่ Species ที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับคน ส่วนใหญ่มีความปลอดภัย แบคทีเรียนี้เป็น aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอด 1 spore ใน 1 เซลล์เท่านั้น พบมีตามดินในสภาพในสภาพแวดล้อมต่างๆ แบคทีเรียจำพวกนี้พบได้ทั่วไปในดิน เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลาย ของซากพืชและซากอื่นๆ แบคทีเรียจำพวกนี้สร้างและหลั่งเอนไซม์จำพวก carbohydrase และ protease ออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด

พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบเชื้อ *Bacillus Subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลอง ใช้ข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48, 52.53, 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ซึ่งทุกกรรมวิธี จะมีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธี เปรียบเทียบอย่างนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคสูงถึง 65.46 % ณัฏฐิมา และคณะ (2547) ได้ศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงถึง 60% แต่การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการทดลองนี้เตรียมในรูปเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแล้วนำไปจุ่มหัวพันธุ์และราดลงบนดินซึ่งเป็นการไม่สะดวกต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในสภาพแปลงและทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมซึ่งส่วนใหญ่ประสิทธิภาพมักจะลดลงอันเนื่องมาจากเซลแบคทีเรียตายลง วงศ์ และคณะ (2548) ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* DOA-WB4 ที่แยกได้จากดินบริเวณรากต้นมันฝรั่งที่ไม่เป็นโรคในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคสามารถป้องกันควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมันฝรั่งที่เกิดจากเชื้อ *R. solanacearum* ได้

บุษราคัม และ ณัฏฐิมา (2550) ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 80 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวมะเขือเทศ และ *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวา การทดสอบในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี dual plate technique ผลการทดสอบ พบว่า *Bacillus* spp. 17 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *F. oxysporum* และ 28 ไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *F. solani* การทดสอบในเรือนทดลอง พบว่า *Bacillus* spp. ไอโซเลท 2G4, 22W10, 20W12,17G18 และ 20W4 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวมะเขือเทศได้ 100% และไอโซเลท 17G18 มีศักยภาพสูงสุดในการควบคุมโรคเหี่ยวแตงกวา 100% โดยไอโซเลท 17G18 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากทั้งเชื้อรา *F.oxysporum* และ *F. solani*

ณัฏฐิมา และคณะ (2551) ศึกษาการเตรียมผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 โดยเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 บนอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar และ บนอาหารเหลว Tryptic Soy Broth ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1 M, methylcellulose ความเข้มข้น 2.5 % และผง talcum 1:4 (V:W) ได้ปริมาณแบคทีเรียในผงเชื้อ คือ$1.1x10^{10}$ และ $0.7x\ 10^{10}$ CFU/กรัม ตามลำดับ นำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C มีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน และ15 เดือน ตามลำดับ เมื่อนำผงเชื้อ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no. 4 ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพของผงเชื้อ *B.subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงพบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 % ในเรือนทดลองและ 30-37 % ในแปลงทดลองปีที่ 1 และ 67.5-72.5% ในปีที่สอง

นิราวดี และคณะ(ไม่ระบุปี พ.ศ.) ได้ทำการศึกษาเบื้องต้นของการควบคุมราก่อโรคพืช *Phytophthora* spp. โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า *Bacillus cereus* สายพันธุ์ MM0508 ยับยั้งการเจริญของรา *P. palmivora* และ *Pseudomonas* sp. สายพันธุ์ MM0573 ยับยั้งการเจริญของรา *P. parasitica* เมื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยราที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยมีลักษณะบวม ขรุขระ และเส้นใยไม่ยืดยาวออกไป ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากสารยับยั้งการเจริญของราที่แบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างขึ้น

Cavaglieri *et al.*, (2005) ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการปกป้องรากพืชจากเชื้อราสาเหตุโรคที่ราก เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สร้างเอนโดสปอร์ (endospores) และมีกลไกในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด ในการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* CE1 เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. verticillioides* และเมื่อทดสอบในระดับโรงเรือน แบคทีเรีย *B. subtilis* CE1 ที่ ความหนาแน่น 10^8 CFU/มิลลิลิตร ยังสามารถลดหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. verticillioides* ทั้งบริเวณภายในและภายนอกราก และแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* CE1 มีศักยภาพที่ดีในการยับยั้งการเจริญของ *F. verticillioides* ในรากของข้าวโพด

Czaczyk *et al.*, (2002) ศึกษา กลไกการยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* ที่แยกได้จากปุ๋ยหมัก ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Bipolaris sorokiniana, Trichothecium roseum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusatium oxysporum, F. Solani* และ *F. Culmorum* พร้อมทั้งตรวจสอบการสร้างประกอบ Ergosterol และนับจำนวนโคโลนีเดี่ยวของเชื้อรา (colony forming units (CFU)) เป็นปัจจัยเสริมเพื่อตรวจดูการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การเพิ่มแบคทีเรีย *B. coagulans* ลงเลี้ยงในอาหารที่เลี้ยงเชื้อรา ทำให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์สร้างสารประกอบ Ergosterol ในเส้นใยเชื้อรา และเกิดการยับยั้งอย่างมากในเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบ เมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อราพร้อมกับแบคทีเรีย *B. coagulans* อย่างไรก็ตามระดับการลดลงของสารประกอบ Ergosterol ไม่มีความสัมพันธ์เสมอไปกับจำนวน โคโลนีเดี่ยวของเชื้อราที่ลดลง

El-hamshary *al.*, (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของ แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ BsGh-18 และ *B. cereus* สายพันธุ์ Bc Nv-29 ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชในดิน *Fusarium solani* พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา F. solani บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี Aysan *et al.*, (2003) รายงานการควบคุมโรคเน่าเละจากเชื้อ *E. chrysanehemi* ของมะเขือเทศ โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกจากบริเวณผิวรากของมะเขือเทศ ซึ่งสามารถควบคุมโรคได้สูงถึง 74%

ในประเทศไทย ได้มีการศึกษาวิจัยการนำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชและสามารถพัฒนาจนได้เป็นสารชีวินทรีย์หลายชนิด ที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ เทียบได้กับสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เช่น ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการผลิตผงเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4 ใช้ในการป้องกันและควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา และแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Alternaria* spp. *Phytophthora palmivora F usarium* spp *Rhizoctonia* sp. *Cercospora* spp. *Acrocylindrium oryzae Erwinia* spp. *Pyricularia oryzae Colletotrichum* spp.*Ralstonia solanacearum และ Xanthomonas campestris* (www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/.../plant_00.html -) นอกจากนี้มีชีวินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเป็นการค้าแล้ว เช่น แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ใช้ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าวหรือโรคที่เกิดจากเชื้อราในดินของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด

โรคเน่าดำหรือใบแห้ง (black rot หรือ leaft blight) หน้าวัว สาเหตุจากเชื้อรา *P. parasitica* เชื้อราสามารถเข้าทำลายพืชได้ทั้งทางใบ และโคนต้น อาการเริ่มแรกที่ใบเกิดเป็นแผลฉ่ำน้ำ ต่อมาแผลขยายเป็นวงกลม ถ้าสภาพชื้นสูง แผลจะลุกลามขยายใหญ่ ถ้าเชื้อเข้าทำลายที่โคนต้นและราก หน้าวัวจะ

แสดงอาการโคนต้นช้ำเป็นสีน้ำตาลรากเน่าดำ เมื่อดึงใบเบา ๆ ก้านใบจะหลุดออกจากต้นได้ง่าย (ปิยรัตน์และสุรภี, 2548)

ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่แยกได้จากดินปลูก ปุ๋ยคอกและวัสดุปลูกต่างๆ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ได้ในอนาคต เพื่อเกษตรจะได้นำไปใช้เพื่อลดการใช้สารเคมีต่อไป

กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด ซึ่งมีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ลักษณะทั่วไปมีการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ลักษณะของดอกกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างจะมีขนาดยาวพอๆ กัน โดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอก ประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรจะปูดออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า “เดือยดอก” สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544)

กล้วยไม้สกุลหวาย จัดเป็นไม้ดอกที่มีสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทย เพราะนอกจากจำหน่ายภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกต่างประเทศเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันการปลูกกล้วยไม้มักประสบปัญหาด้านโรคพืชและแมลง ซึ่งทำให้ผลผลิตของกล้วยไม้ลดลง และไม่ได้มาตรฐาน (กรมวิชาการเกษตร, 2547) จากการสำรวจโรคที่สำคัญของกล้วยไม้ พบว่าโรคเน่าเละจัดเป็นโรคที่สำคัญอย่างหนึ่งที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกร เนื่องจากหากเกิดปัญหาการระบาดแล้ว จะทำให้ต้นเน่าตายเสียหายในเวลาอันรวดเร็ว ก่อให้เกิดอาการใบเน่า ต้นเน่า ใบเน่าพอง จากการจำแนกเชื้อสาเหตุเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* โดยพบการระบาดทำความเสียหายในกล้วยไม้สกุลการค้าหลายสกุล ที่สำคัญได้แก่ หวาย แวนดา ช้าง และออนซิเดียม (ปิยรัตน์และจงวัฒนา, 2551)

จากรายงานยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าเละได้ Uchida (2006) ได้รายงานว่า โรคเน่าเละเป็นสาเหตุหลักที่สร้างความเสียหายให้กับการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวายของฮาวาย การควบคุมโรคด้วยสารประกอบคอปเปอร์ มักพบปัญหาของการแพ้สารเคมี ส่วนการใช้สารปฏิชีวนะ ทำให้เชื้อสาเหตุเกิดการดื้อยาได้ง่าย ปัจจุบันทั้งต่างประเทศและในประเทศ ได้ศึกษาค้นคว้าหาชีวภัณฑ์มาใช้ในการควบคุมโรคพืชโดยชีวิธี เช่น Aysan et al. (2003) ได้ศึกษาการควบคุมโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อ *E. chrysanehemi* ของมะเขือเทศ โดยใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่แยกจากบริเวณผิวรากของมะเขือเทศ ซึ่งสามารถควบคุมโรคได้สูงถึง 74% นอกจากนั้นยังมีรายงานการควบคุมโรคเน่าเละโดยชีววิธีในไม้ดอกไม้ประดับและพืชอีกหลายชนิด เช่น ลิลลี่ และมันฝรั่ง โดยใช้แบคทีเรีย *Erwinia herbicola* Ech252 (Vanneste, 2009) ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี นับว่าเป็นแนวทางในการควบคุมโรคที่ปลูกภายในโรงเรือน ซึ่งเป็นการควบคุมโรคอย่างยั่งยืน และลดปัญหาการใช้สารเคมีควบคุมโรคพืชในอนาคตต่อไป

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* มีลักษณะที่สำคัญคือไม่สร้าง asexual spore คงมีแต่เส้นใย เส้นใยจะอัดรวมกันเป็นเม็ด Sclerotia เพื่ออยู่ข้ามฤดูโดยเม็ด Sclerotia จะอยู่ในดินและซากพืชหรือพืชอาศัยและแพร่ระบาดทำความเสียหายในฤดูปลูกต่อไป เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ด และต้นกล้าที่ยังไม่โผล่พ้นระดับผิวดิน และเน่าระดับดินเช่นโรคโคนเน่าของกล่ำปลี พีระวรรณ (2546)รายงานว่าโรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้ตั้งแต่ระยะกล้าข้าวโพดที่อ่อนแอจะทำให้ต้นกล้าเน่าหัก

พับล้มลง และพบอาการของโรคบนส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพด เช่น ลำต้น ใบ กาบใบ กาบฝัก และฝัก มีรายงานว่าดินที่มีเชื้อ R. solani อยู่ 15,19 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลผลิตข้าวโพดลด 47 , 42 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Sumner and Minton, 1989) โรคกาบใบแห้งของข้าวโดยพบว่าระยะข้าวแตกกอ ลักษณะแผลสีเขียวปนเทาปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำแผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นถึงใบข้าวถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้งผลผลิตลดลง(กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) มีรายงานว่าใช้สาร Validamycin สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด(Dalmacio et al ., 1990)

พริกจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เพราะนอกจากจะใช้บริโภคภายในประเทศแล้ว พริกยังเป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่ง แต่ที่ผ่านมาเกษตรกรยังคงประสบปัญหาในด้านศัตรูพืช เช่น แมลง และ โรค โดยโรคที่เป็นปัญหาหลักของเกษตกรในการผลิตพริกให้ได้ผลผลิตที่ดีมีคุณภาพคือโรคแอนแทรคโนส ซึ่งสาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* อาการของโรคมักพบบนผลพริกที่เริ่มสุก หรือระยะก่อนที่ผลพริกจะเปลี่ยนสี อาการเริ่มแรกจะประกฏเป็นวงกลมช้ำสีน้ำตาล เนื่อเยื่อบุ๋มลึกลงไปจากระดับเดิมเล็กน้อย และจะค่อย ๆ ขยายกว้างออกไปเป็นวงกลมหรือวงรีรูปไข่ ซึ่งมองเห็นลักษณะของเชื้อราที่เจริญภายใต้เนื้อเยื่อของพืชขยายออกไปในลักษณะที่เป็นวงกลมสีดำซ้อนกันเป็นชั้น เมื่อมีความชื้นจะเห็นเป็นเมือกเยิ้มสีส้มอ่อน ๆ บริเวณแผลบนผลพริก ทำให้แผลขยายตัวและผลพริกจะเน่าและร่วงก่อนเก็บเกี่ยว ผลพริกนี้เมื่อนำไปตากแห้งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซีด โดยโรคนี้มักระบาดมากในสภาพความชื้นสูง โดยเฉพาะในช่วงที่พริกกำลังให้ผลผลิต และเชื้อราสามารถติดไปกับเมล็ด (ศิริพงษ์ และพรพิมล, 2554) เกษตรกรส่วนใหญ่มักเลือกใช้วิธีการควบคุมโรคพืชโดยใช้สารเคมี เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และได้ผลรวดเร็ว ซึ่งผลจากการใช้สารเคมีที่ไม่ถูกวิธี หรือใช้มากจนเกินไป ส่งผลเสียตามมาหลายประการ เช่น เกิดการดื้อยาของเชื้อโรค มีสารตกค้างในผลิตผล ตลอดจนเกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในสภาพธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม เกิดผลเสียโดยตรงต่อผู้ใช้ได้แก่ตัวเกษตรกรเองและผู้บริโภค นอกจากนี้โดยทางอ้อม ส่งผลถึงการกีดกันทางการค้า เนื่องมาจากภายใต้เงื่อนไขข้อตกลงขององค์การการค้าโลก (WTO) สินค้าทางการเกษตรที่จะส่งไปขายยังประเทศคู่ค้าจะต้องมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้น การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมโรคพืชทั้งในปัจจุบันและอนาคต เพื่อลดปัญหาจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชดังกล่าวที่นับวันจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาวิจัยทั้งในประเทศและต่างประเทศ ที่จะนำจุลินทรีย์ ซึ่งเรียกว่า “ จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) “ ในธรรมชาติมาควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืช และในปัจจุบันก็เป็นที่ยอมรับว่าเป็นวิธีที่มีโอกาสสูงในการนำไปเป็นกลยุทธ์ป้องกันกำจัดโรคพืช เนื่องจากมีการนำไปใช้อย่างได้ผลดีและสามารถพัฒนาเป็นการค้าได้หลายชนิด เช่น ในประเทศออสเตรเลียได้พัฒนาใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในทางการค้าสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium radiobecter* K84 ที่เป็นพวกซาโปรไฟท์ไปควบคุมโรคปุ่มปมของพืชที่เกิดจากเชื้อ *A. tumefaciens* แบคทีเรียกลุ่ม pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสง มีความสามารถในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราและแบคทีเรียที่ติดไปกับดิน ซึ่งเป็นเชื้อโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชอย่างมาก หรือแบคทีเรีย Bacillus หลายชนิดมีรายงานว่า มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อโรคได้เช่นเดียวกับ pseudomonads ชนิดสร้างสารเรืองแสงในพืชหลายชนิด ทั้งสภาพเรือนปลูกพืชทดลองและแปลงทดลอง (นิพนธ์, 2538)

โรคแอนแทรคโนสของพริก นับว่าเป็นโรคที่สำคัญของเกษตรกรผู้ปลูกพริกเป็นอย่างมาก โรคนี้เกิดจากเชื้อรา *Collectotrichum* sp. ที่พบเข้าทำลายพริกก็มีอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน *C. gloespoloides* C. capcisi และ *C. piperatum* ผลพริกที่ถูกเชื้อราสาเหตุโรคเข้าทำลายจะมีอาการตามชนิดของเชื้อรา โดยปกติในพริกผลใหญ่เชื้อราสาเหตุที่เข้าทำลายคือ *C. gloespoloides* ลักษณะการเข้าทำลายก็คือ จะเกิด

จุดฉ่ำน้ำขึ้นโดยที่ผิวของผลพริกจะมีรอยบุ๋มเล็กน้อย และมีอาการฉ่ำน้ำเป็นรูปวงกลมหรือวงรี ต่อมาแผลจะค่อย ๆ ขยายออกเชื้อราจะสร้างสปอร์ซึ่งเห็นเป็นวงกลมสีดำชัดเจน

Bacillus เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก แบคทีเรียชนิดนี้สามารถพบได้ทั่ว ๆ ไป ในดินปลูก ปุ๋ยคอก วัสดุปลูก รากพืช และผิวใบ ฯลฯ แบคทีเรียนี้สามารถหลั่งสารประกอบต่างๆ ที่สร้างขึ้นออกสู่ภายนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบคทีเรียนี้เพียงไม่กี่ Species ที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคกับคน ส่วนใหญ่มีความปลอดภัย แบคทีเรียนี้เป็น aerobic bacteria ที่สร้างสปอร์ที่เรียกว่า endospore ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมเพื่อการอยู่รอด 1 spore ใน 1 เซลล์เท่านั้น พบมีตามดินในสภาพในสภาพแวดล้อมต่างๆ แบคทีเรียจำพวกนี้พบได้ทั่วไปในดิน เจริญเติบโตได้โดยใช้สารอาหารจากการย่อยสลาย ของซากพืชและซากอื่นๆ แบคทีเรียจำพวกนี้สร้างและหลั่งเอนไซม์จำพวก carbohydrase และ protease ออกนอกเซลล์ได้หลายชนิด

ปฏิมาพรและคณะ (2551) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ Bacillus sp. SPT41.1.3 ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าโดยวิธี standard blotter plate พบว่าการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 41.90% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ Bacillus sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ rifampicin มีประสิทธิภาพในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส โรคใบจุดเซอร์คอสปอรา และโรครากและโคนเน่าของพริกชี้ฟ้าในสภาพแปลงทดลอง โดยหลังเสร็จสิ้นการทดลอง พบว่าเชื้อ *Bacillus* spp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดอยู่บนผิวพืช และในดินรอบรากต้นพริกชี้ฟ้าได้

ณัฏฐิมาและคณะ (2548) ได้ทำการแยกเชื้อ *Bacillus* sp. จากดิน, รากพืชและปุ๋ยคอก ได้จำนวน 525 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *R. solanacearum* พบว่า มี 4 ไอโซเลท ที่สามารถควบคุมและลดการเกิดโรคเหี่ยวของขิงได้ประมาณ 70-100%

บุษราคัม และ ณัฏฐิมา (2550) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ จำนวน 80 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกบนผลพริก พบว่ามี 13 ไอโซเลท ได้แก่ 17G18 20W33 2G7 20W16 20W1 20W8 20W5 1G8 2G23 22W8 19W36 22W10 และ 20W3 ที่สามารถควบคุมการเกิดโรคบนผลพริกได้ โดยไอโซเลท 20W16 22W8 และ 1G8 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเกิดโรคสูงสุด

พากเพียร และคณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *Bacillus Subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลงนาทดลอง ใช้ข้าวพันธุ์ กข 23 พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48, 52.53, 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ซึ่งทุกกรรมวิธี จะมีระดับความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธี เปรียบเทียบอย่างนัยสำคัญทางสถิติซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคสูงถึง 65.46 เปอร์เซ็นต์

ได้มีการศึกษาความปลอดภัยของ *B. subtilis* ต่อคน โดย อมรรัตน์ และ มณจันทร์ (2539) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ *B. subtilis* AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืช ในหนูถีบจักรเพื่อยืนยันความปลอดภัยนี้ โดยได้ทดสอบความเป็นพิษของแบคทีเรียนี้ชนิดผง 2 ชนิด โดยผสมกับอาหารในอัตรา 1:10 โดยน้ำหนักซึ่งเป็นอัตราที่แนะนำใช้ทาแผลบนต้นพืช ทำการทดสอบกับหนูถีบจักร ให้อาหารทางปากในอัตรา 10 กรัมต่อวันต่อตัวโดยเฉลี่ยเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าหนูในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีวภัณฑ์แบคทีเรียผสมอาหารทั้ง 2 ชนิด มีอัตราการ

เจริญเติบโตไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และจากการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบลักษณะรอยโรคที่อวัยวะภายใน และไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติใดๆ ทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ กระเพาะอาหาร และลำไส้เกิดขึ้น

พริกเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่ใช้บริโภคทั้งภายในประเทศและส่งออกไปยังต่างประเทศ การผลิตพริกที่มีคุณภาพมักประสบปัญหาศัตรูพืชต่างๆ ได้แก่ วัชพืช โรคพืช และแมลง ศัตรูพืชโดยเฉพาะโรคแอนแทรคโนส นับเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของพริก ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd. & P. Syd.) Butl. & Bisby และ *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ นอกจากนี้ยังสามารถติดไปกับเมล็ดได้ โดยเฉพาะเชื้อรา *C. capsici* สามารถถ่ายทอดโรคได้ทางเมล็ด (seed borne) เมล็ดพริกแสดงการเป็นโรคได้ถึง 48 เปอร์เซ็นต์ หากผลพริกมีการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดนี้เมล็ดพันธุ์พริกที่เก็บเกี่ยวได้ก็จะอาจมีเชื้อปนเปื้อนไปด้วย และเมื่อนำเมล็ดพันธุ์เหล่านี้ไปเพาะปลูกก็จะกลายเป็นแหล่งเพาะเชื้อที่ดีในแปลงปลูกต่อไป (สมศิริ, 2521) การป้องกันกำจัดโรคเกษตรกรส่วนใหญ่ใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนส แม้ว่าการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดสัตรูพืชในระยะแรกจะพบว่ามีประสิทธิภาพสูงมาก แต่ก็มักก่อให้เกิดปัญหาหลายอย่างตามมา เช่น ปัญหาการตกค้างของสารเคมีในผลิตผลเกษตร ในธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม รวมทั้งก่อให้เกิดโทษกับสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภค จึงมีการตื่นตัวลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดสัตรูพืช มีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งพบว่ามีความปลอดภัยมากกว่าการใช้สารเคมีและปราศจากพิษตกค้าง เช่น การใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* ของขิงและมะเขือเทศ (ณัฏฐิมาและคณะ, 2547) การใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งแยกจากดินปลูก ปุ๋ยคอก และวัสดุปลูกจากแหล่งต่างๆ 80 ไอโซเลท เพื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกบนผลพริก (บุษราคัมและณัฏฐิมา, 2550) เป็นต้น ดังนั้นจึงควรที่จะทำการศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก เพื่อทดสอบความสามารถและนำไปใช้ร่วมกับสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในระดับแปลงปลูกพืชของเกษตรกร เป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรในการเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดโรคแอนแทรคโนสพริกเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชต่อไป

แบคทีเรีย *R. solanacearum* (syn. *Pseudomonas solanacearum*) เป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง ทำให้เกิดโรคเหี่ยวที่ก่อความเสียหายกับพืชปลูกหลายชนิด ตั้งแต่พืชเศรษฐกิจจนถึงวัชพืชมากกว่า 200 ชนิดในวงศ์ *Solanaceae* (Hayward, 1964) ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่แบคทีเรียเข้าทำลาย สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรีย ในประเทศไทยมีพืชหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยของแบคทีเรียสาเหตุโรคนี้ โดยเฉพาะพืชเศรษฐกิจของประเทศได้แก่ มันฝรั่ง ขิง ปทุมมา เป็นต้น การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยากเนื่องจากแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถมีชีวิตอยู่ในดินเป็นเวลานานและมีพืชอาศัยกว้าง ไม่มีสารป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรค มีรายงานการใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรมและการใช้ชีววิธีในการควบคุมโรค ซึ่งพบว่าการใช้ชีววิธีควบคุมโรคเหี่ยวมีความเป็นไปได้สูง และเป็นที่ยอมรับอย่างมาก การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธีเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่ช่วยลดปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่ไม่ถูกต้อง และเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในการควบคุมสาเหตุโรคพืชทั้งราและแบคทีเรีย จนกระทั่งผลิต

รูปแบบผลิตภัณฑ์ และจำหน่ายเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลายเช่น รา *Trichoderma* และแบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นต้น

แบคทีเรีย *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ มีอยู่มากมายทั้งในดิน ตามผิวพืชและแหล่งอาหารที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตสูงและสามารถแยกได้ง่าย และเจริญได้รวดเร็วที่บริเวณรากพืช นอกจากนี้แบคทีเรีย *B. subtilis* ยังมีความสามารถในการสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนและสามารถสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) (Baker and Cook, 1974) มีรายงานการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้แก่ Celino and Gotllieb (1952) ศึกษาการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* B_3 A ใส่ลงในดินที่มีแบคทีเรียสาเหตุโรคสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้และลดการเกิดโรคจาก 70 เปอร์เซ็นต์ เหลือเพียง 33 เปอร์เซ็นต์ Aspiras and de la Cruz (1985) ได้รายงานการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus polymyxa* FU 6 และ *Pseudomonas fluorescens* ที่มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวในมะเขือเทศ และมันฝรั่ง เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญที่บริเวณรากของต้นกล้าได้ดี และสามารถป้องกันการเข้าทำลายของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ Karuna *et al.* (1997) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่ใช้ในการป้องกันกำจัดแบบชีววิธี ได้แก่ *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* และ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าแบคทีเรีย *P. fluorescens* มีประสิทธิภาพมากที่สุด รองลงมาได้แก่ *B. subtilis* เมื่อนำไปใช้ในเรือนทดลอง พบว่าสามารถควบคุมโรคเหี่ยวของต้นมะเขือเทศที่เจริญเติบโตในดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ดี Sanaina *et al.* (1997) ศึกษาแบคทีเรียจากบริเวณรากของต้นมันฝรั่งโดยแยกแบคทีเรียจากรากของต้นปกติและรากของต้นที่เป็นโรค นำมาคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus cereus, B. subtilis* และ *Enterobacter cloaceae* ที่แยกได้จากรากมันฝรั่ง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยทำการศึกษากับดินที่มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* 3 แห่งของประเทศอินเดีย คือ เมือง Bhowali Palampur และ Bhubaneswar สามารถลดการเกิดโรคได้ 66-83, 27-70 และ 24-71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าที่เมือง Bhowali และ Bhubaneswar มีผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 160 เปอร์เซ็นต์ Guo *et al.* (2002) รายงานการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกโดยชีววิธี โดยใช้แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* สายพันธุ์ J3, แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สายพันธุ์ BB11 และ FH17 ที่มีคุณสมบัติช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตให้ต้นพริก (Plant Growth Promoting Rhizosphere Bacteria) สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกที่เกิดจากแบคทีเรีย *R. solanacearum* ได้ 30 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ J3 และ BH11 สามารถทำให้โรคลดลง 54 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 80-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่แบคทีเรียปฏิปักษ์ FH17 สามารถทำให้โรคลดลง 34 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาผสมกันในอัตรา 1:1:1 พบว่าสามารถทำให้โรคลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 200เปอร์เซ็นต์

วงศ์และคณะ (2548) ทำการทดลองใช้วิธีการต่างๆ ในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวในมันฝรั่ง พบว่าการใช้เชื้อปฏิปักษ์ DOA-WB4 เพียงอย่างเดียวสามารถควบคุมการเกิดโรคนี้ได้คุ้มทุนที่สุด ณัฏฐิมา และคณะ (2551) พบว่าเชื้อ *B. subtilis* ที่แยกได้จากดินบริเวณรากยาสูบ (ดินรากยาสูบ no.4) สามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพืชได้หลายชนิด บูรณี และคณะ (2554) รายงานว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ UB No.2 และ UB No.25 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในโรงเรือนทดลองได้ 60 และ 66.67 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB No.2 และ UB No.25 มาใช้ในการควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกในแปลงทดลอง และแปลงเกษตรกร เพื่อให้ได้เชื้อ

แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกที่มีประสิทธิภาพ และสามารถแนะนำให้เกษตรกรนำไปใช้ป้องกันกำจัดโรคนี้ได้

การปลูกพืชตระกูลแตงเป็นการค้า เช่น แตงกวา แตงโม แคนตาลูป และฟักทอง เกษตรกรผู้ปลูกแตงเป็นการค้ามักประสบปัญหาการเข้าทำลายของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* spp. อยู่เสมอ โรคที่มักจะเกิดจากเชื้อราสกุล *Fusarium* คือโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ที่เกิดกับพืชตระกูลแตงในระหว่างการปลูกในแปลงปลูก และโรคผลเน่า ทั้งที่เกิดขึ้นกับผลแตงในระยะการปลูก และมักจะพบในระยะที่ผลแตงที่เก็บเกี่ยวมาแล้ว และรอการขนส่งจำหน่าย ในต่างประเทศพบว่าโรคผลเน่าเป็นปัญหาที่สร้างความเสียหายให้กับการปลูกแตงเป็นการค้ามาก โดยมีรายงานการพบเชื้อราสกุล *Fusarium* หลายชนิด ที่ทำให้เกิดโรคผลเน่า ได้แก่ *F. graminum, F. acuminatum, F. culmorum,* and *F. moniliforme, F. semitectum, F. equiseti, F. scirpi,* และ *F. solani* ซึ่งลักษณะอาการที่เกิดบนผลแตงก็จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา *Fusarium* สำหรับในประเทศไทย ความเสียหายในพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium* นั้น เป็นอาการโรคเหี่ยว (Fusarium wilt) ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium* 2 ชนิด ได้แก่ *F. oxysporum* และ *F. solani* โดยเชื้อรา *F. solani* มีแนวโน้มว่าจะพบทำให้เกิดโรคเหี่ยวมากขึ้น โดยเฉพาะกับแตงกวาที่ปลูกเป็นการค้า อาการของโรคจะพบเห็นชัดเจน เมื่อใบและลำต้นของแตงเหี่ยวเฉาเป็นสีเหลือง และแห้งเป็นสีน้ำตาล ซึ่งอาการเริ่มแรกนั้นมาจากโคนต้นของแตงกวา ที่มีแผลแห้งตายสีน้ำตาลเนื่องจากเชื้อสาเหตุเข้าทำลายทางราก จนทำให้เนื้อเยื่อท่อลำเลียงเน่า และแห้งตายในที่สุด จากปัญหาที่เกิดขึ้น แม้ว่าจะมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในการป้องกันกำจัดหรือควบคุมการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* เป็นเชื้อราที่อาศัยในดิน และมีการอยู่รอดในเศษซากพืชข้ามฤดูได้ ทำให้การใช้สารเคมียังไม่ได้ผลดี คุ้มค่ากับค่าใช้จ่ายที่เสียไป แต่กลับทำให้เสียเงินลงทุนทำการเกษตรมากขึ้น ในขณะที่ราคาผลผลิตเกษตรยังคงตกต่ำ เช่นปัจจุบัน จากปัญหาการระบาดและเข้าทำลายของเชื้อรากลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น ใช้ต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเนื่องหลังการใช้ ทดแทนการใช้สารเคมีที่ ซึ่งปัจจุบันวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการใช้แบคทีเรีย *B. subtilis* เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช จากข้อมูลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา

Abeysinghe และคณะ (2007) ศึกษาผลของแบคทีเรียที่อยู่บริเวณรากของถั่วในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* สาเหตุโรครากเน่า (root rot) ของถั่วในประเทศศรีลังกา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *B. subtilis* CA32 มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรครากเน่า

Cavaglieri และคณะ (2005) ศึกษาผลของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการปกป้องรากพืชจากเชื้อราสาเหตุโรคที่ราก เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สร้างเอนโดสปอร์ (endospores) และมีกลไกในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุของโรคพืชได้หลายชนิด ในการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* CE1 เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ดีที่สุดในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. verticillioides* และเมื่อทดสอบในระดับ

Czaczyk และคณะ (2002) ศึกษา กลไกการยับยั้งเชื้อราของแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* ที่แยกได้จากปุ๋ยหมัก ในการเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืช 7 ชนิด ได้แก่ *Bipolaris sorokiniana, Trichothecium roseum, Rhizoctonia solani, Sclerotinia sclerotiorum, Fusatium oxysporum, F. solani* และ *F. culmorum*

El-hamshary และคณะ (2008) ศึกษาประสิทธิภาพของ แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ BsGh-18 และ *B. cereus* สายพันธุ์ Bc Nv-29 ในการควบคุมเชื้อราโรคพืชในดิน *Fusarium solani*

พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา F. solani บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี

ดังนั้นจึงได้วางแผนการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีการจำหน่ายเป็นการค้าและที่มีการทดสอบแล้วว่าสามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* มาใช้เป็นทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. solani* ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของแตงกวาสาเหตุจาก เชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ซึ่งคาดว่าผลการศึกษาและข้อมูล รวมถึงผลสรุปที่ได้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในการป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพื่อสร้างระบบเกษตรกรรมของประเทศไทยให้ยืนยง และยั่งยืนสืบต่อไป

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช

โรคยางไหล (Gummy Stem Blight) เกิดจากเชื้อสาเหตุ *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. เป็นโรคสำคัญที่พบมีการระบาดและเข้าทำลายในพืชตระกูลแตง ประเทศไทยพบมีการระบาดในพืชตระกูลแตง ในพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ลักษณะอาการของโรคเริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ซึ่งด้วยลักษณะอาการของโรคเช่นนี้ จึงได้มีการตั้งชื่อโรคตามอาการโรคที่พบ คือ โรคยางไหล ถ้าโรคมีการระบาดในระยะที่ติดผล จะทำให้ต้นแตงมีการเจริญเติบโตช้า ผลโตไม่เต็มที่ และในต้นที่อาการรุนแรงมาก ต้นจะเหี่ยวแห้งและยืนต้นตาย ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง บางครั้งเกษตรกรจึงรีบเก็บผลผลิตก่อน ทั้งที่แตงยังสุกไม่เต็มที่ทำให้ผลผลิตของแตงไม่ได้คุณภาพ (ทัศนาพรและพีระวรรณ , 2552)

ลักษณะอาการของโรคยางไหล เริ่มแรกจะพบแผลฉ่ำน้ำที่บริเวณ ลำต้น กิ่ง ก้าน และใบ โดยเฉพาะบริเวณข้อต่อของลำต้นกับกิ่ง หลังจากนั้นส่วนทีเป็นแผลจะบุ๋มลึก และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลแดง ลักษณะสำคัญของโรคคือ ที่แผลจะมียางเหนียวสีแดง (gummy ooze) ไหลเยิ้มออกมาจากแผล และเกาะแห้งอยู่ที่บริเวณแผล ส่วนอาการที่ใบก็จะพบใบเป็นแผลฉ่ำน้ำก่อน จากนั้นแผลที่ใบจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ลุกลามไปตามเส้นกลางใบทำให้ใบไหม้ วงจรการเกิดโรคของเชื้อรา *D. bryoniae* สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne , soil borne) และอยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน perithecium เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมคือ มีความชื้นสูง perithecium ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้าง และปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำ

วงจรการเกิดโรค เนื่องจากเชื้อรา *D. bryoniae* ที่สามารถอาศัยและติดไปได้ทั้งในเมล็ดพันธุ์และดิน (seed borne , soil borne) อยู่ข้ามฤดูได้เป็นเวลานานในเศษซากพืชที่เป็นโรค โดยอาศัยอยู่ใน pycnidia เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมคือ มีความชื้นสูง pycnidia ที่อยู่บนเศษซากพืชก็จะเจริญแล้วสร้าง และปล่อย conidia ออกมา และ conidia นี้สามารถแพร่กระจายไปกับน้ำฝน หรือระบบการให้น้ำ Sudisha และคณะ (2005) ได้ทดสอบผลของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 2 ชนิด คือ เชื้อรา *T. hazianum* และ*Pseudomonas fluorescens* ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเกิดโรคได้และเพิ่มผลผลิตของแคนตาลูปด้วย Abd-El-Moity และคณะ (2009) ได้รายงานว่า การใช้เชื้อ *Pseudomonas fluorescens* , Bacillus subtilis ผสมร่วมกับเชื้อรา *T. hazianum* ในการป้องกันกำจัดโรคที่เกิดจากเชื้อราในพืชตะกูลแตงได้ดีเช่นเดียวกัน เนื่องจากการศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อรา *D. bryoniae* โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรค มีการศึกษาและนำมาใช้ได้น้อย ซึ่งจากรายงานพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. และ เชื้อ

Bacillus sp. มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราในดินได้ดี และนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อรา *D. bryoniae* ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ แต่ในสภาพแปลงทดลองยังไม่เคยมีการศึกษา ดังนั้นเพื่อได้วิธีการควบคุมโรคยางไหลโดยชีววิธี จึงต้องมีการคัดเลือก ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

ในปี 2554 ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการโรคยางไหล ที่ จ.สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา เพื่อแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากตัวอย่างพืช พบว่า สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท และแยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection จำนวน 40 ไอโซเลท และ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากส่วนของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท รวม 54 ไอโซเลท ผลการทดลองในปี 2554 สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี ทั้งหมด 34 ไอโซเลท และในปี 2555 ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ผลการทดลอง พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ดี ทั้งหมด 64 ไอโซเลท ซึ่งในการทดลองต่อไปจะนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยการวัดขนาดการสร้าง clear zone ที่กว้าง และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อในสภาพแปลงทดลองต่อไป และเพื่อให้การจัดการโรคโดยชีววิธีมีประสิทธิภาพสูงสุดนั้น ต้องมีการทดสอบวิธีการนำเชื้อไปใช้ในวิธีการต่างๆร่วมกันในการป้องกันกำจัดโรค เพราะบางครั้งการป้องกันกำจัดโรคโดยการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชอย่างเดียว อาจทำให้เชื้อเกิดการดื้อยา เป็นอันตรายต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม การเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมีได้ ดังนั้นเพื่อให้การป้องกันกำจัดโรคยางไหลมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปสู่การจัดการโรคโดยชีววิธีได้ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ได้มีการศึกษาแล้วนำมาใช้ร่วมกันในการป้องกันกำจัดโรคแบบผสมผสานต่อไป

กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชที่มีการส่งออกทั้งในรูปของดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้ โดยมีมูลค่าการส่งออกปีละประมาณ 1,500 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 90 ของมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2544) กล้วยไม้ที่เกษตรกรนิยมปลูกมีหลายสกุล เช่น กล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ม็อคคารา ออนซิเดียม แวนด้า แอสโคเซนดา อะแรนดา และคัทลียา ซึ่งแหล่งปลูกที่สำคัญคือ จังหวัด นครปฐม กรุงเทพฯ สมุทรสาคร นนทบุรี ราชบุรี อยุธยา ปทุมธานี ชลบุรี และสุพรรณบุรี (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544) โรคพืชนับเป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการผลิตกล้วยไม้ เพราะโรคพืชมีผลทำให้ผลผลิตกล้วยไม้ต่ำ และไม่ได้มาตรฐาน โดยเฉพาะโรคเน่าสีน้ำตาล (bacterial brown rot) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* ถ้าอาการรุนแรงจะทำให้กล้วยไม้เน่ายุบตายทั้งต้น เนื่องจากสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียมีน้อย การใช้เป็นติดต่อกันเป็นเวลานานจะมีผลทำให้เชื้อสาเหตุโรคเกิดการดื้อสารเคมีและทำให้มีสารเคมีตกค้าง ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้โดยใช้ชีววิธี โดยมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวพืชในสภาพธรรมชาติ มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่า สีน้ำตาลของกล้วยไม้ทั้งในห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการศึกษานี้คาดหวังว่าจะสามารถนำไปพัฒนาและใช้เป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีได้อีกทางหนึ่ง

โรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้มีสาเหตุจากเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* (ชื่อเดิม *Pseudomonas cattleyae*) ลักษณะอาการที่พบเริ่มแรกแผลจะมีอาการฉ่ำน้ำสีเหลืองอ่อน มีวงสี

เหลืองล้อมรอบ แผลจะมีการพัฒนาขยายขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนเนื้อเยื่อบริเวณกลางแผลมีการยุบตัวลงไปจากผิวใบ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำ มีลักษณะแข็ง แผลมีรูปร่างไม่แน่นอน พบได้ทั้งใบแก่และใบอ่อน มีการระบาดรุนแรงในช่วงฤดูฝน อาจจะพบลักษณะอาการอีกแบบคือ แผลสีขาว เป็นวงสีน้ำตาลหรือเทา ที่ขอบแผลชั้นกลาง จะเป็นสีดำขรุขระ รูปร่างไม่แน่นอน ขอบแผลนอกสุดมีสีเหลืองล้อมรอบ (Divinagracia *et al*., 1984) เชื้อแบคทีเรีย *A. avenae subsp. cattleyae* สามารถเข้าสู่ใบกล้วยไม้ได้ทางบาดแผล (wound) ช่องเปิดธรรมชาติของใบ (hydrathods) เชื้อสามารถแพร่กระจายโดยกระเด็นไปกับน้ำที่ใช้รดโดยเฉพาะวิธีการให้น้ำด้วยระบบสปริงเกอร์จะส่งผลให้เชื้อสามารถแพร่กระจายไปได้ดี (Miller, 1990) พบการระบาดในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลแวนดา (Vanda Hybrid) แคทลียา (Cattleya) ฟาแลนนอปซิส (Phalaenopsis) ซิมบิเดียม (Cymbidium) เดนโดรเบียม (Dendrobium) ม็อคคาร่า (Mokara) และออนซิเดียม (Oncidium) (Miller, 1990) ในเกือบทุกแหล่งที่มีการปลูกกล้วยไม้ ซึ่งจะพบการระบาดของโรคนี้มากในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝน โดยเชื้อสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำได้ดี จากการศึกษาระบบนิเวศวิทยาเชื้อแบคทีเรีย *A. avenae* subsp. *cattleyae* จัดอยู่ในกลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยในดินได้ระยะสั้น (นิพนธ์ , 2533) เชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดในเศษซากใบกล้วยไม้ที่เกิดโรคได้ช่วงระยะหนึ่ง เมื่อเศษซากพืชดังกล่าวย่อยสลายไป เชื้อแบคทีเรียก็จะตายเพราะสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพ

การป้องกันกำจัดโรคนี้ทำได้ยาก โดยแนะนำให้ตัดใบที่เป็นโรคออกจากต้น แล้วนำไปเผาทำลาย ลดการให้น้ำแบบสเปรย์เหนือทรงพุ่ม (overhead) เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นอื่นๆ เนื่องจากเชื้อสาเหตุโรคสามารถแพร่กระจายไปกับน้ำได้ดี เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมการแพร่กระจายของโรคก็จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มีรายงานการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย โดยการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชในกลุ่มสเตร็ปโตมัยซินซัลเฟต ผสมออกซีเตทตราไซคลินไฮโดรคลอไรด์หรือ คอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ หรือ คิวปริคออกไซด์ เมื่อเริ่มพบอาการของโรคบนใบกล้วยไม้ (Miller, 1990) ซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อสาเหตุได้โดยตระหนักถึงอันตรายจากการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมและช่วยแก้ปัญหาการดื้อสารเคมีของศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด ตลอดจนเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาใช้วิธีใดวิธีหนึ่งที่เหมาะสมในการควบคุมศัตรูพืชแก่เกษตรกร ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นงานวิจัยเพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในระดับห้องปฏิบัติการ และเรือนปลูกพืชทดลอง และพัฒนาเพื่อใช้ในการป้องกันกำจัดในสภาพแปลงปลูกทดลอง

เชื้อรา *Rhizoctonia solani* มีลักษณะที่สำคัญคือไม่สร้าง asexual spore คงมีแต่เส้นใย เส้นใยจะอัดรวมกันเป็นเม็ด Sclerotia เพื่ออยู่ข้ามฤดูโดยเม็ด Sclerotia จะอยู่ในดินและซากพืช หรือพืชอาศัยและแพร่ระบาดทำความเสียหายในฤดูปลูกต่อไป เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดโรคกับพืชหลายชนิด ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อราชนิดนี้ ส่วนใหญ่ทำให้เกิดอาการเน่าบนเมล็ด และต้นกล้าที่ยังไม่โผล่พ้นระดับผิวดิน และเน่าระดับดินเช่นโรคโคนเน่าของกล่ำปลี พีระวรรณ (2546)รายงานว่าโรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดสามารถเข้าทำลายข้าวโพดได้ตั้งแต่ระยะกล้าข้าวโพดที่อ่อนแอจะทำให้ต้นกล้าเน่าหักพับล้มลง และพบอาการของโรคบนส่วนต่าง ๆ ของข้าวโพด เช่น ลำต้น ใบ กาบใบ กาบฝัก และ ฝัก มีรายงานว่าดินที่มีเชื้อ *R. solani* อยู่ 15,19 และ 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลผลิตข้าวโพดลด 47 , 42 และ 8 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Sumner and Minton, 1989) โรคกาบใบแห้งของข้าวโดยพบว่าระยะข้าวแตกกอ ลักษณะแผลสีเขียวปนเทาปรากฏตามกาบใบตรงบริเวณใกล้ระดับน้ำแผลจะลุกลามขยายใหญ่ขึ้นจนมีขนาดไม่จำกัดและลุกลามขยายขึ้นถึงใบข้าวถ้าเป็นพันธุ์ข้าวที่อ่อนแอ แผลสามารถลุกลามถึงใบธงและกาบหุ้มรวงข้าว ทำให้ใบและกาบใบเหี่ยวแห้งผลผลิตลดลง(กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, 2543) บุษราคัมและ คณะ (2557) ได้รายงานการศึกษา *B. subtilis* ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า พบว่า กรรมวิธีที่พ่น

ด้วยชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุด สามารถลดการเกิดโรคได้เท่ากับ 32.88% การทดสอบอัตราการใช้ของ ชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 พบว่า อัตรา 20 - 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP และอัตรา 40 – 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ให้ผลดีกว่าการพ่นด้วยสาร mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีรายงานว่าใช้สาร Validamycin สามารถควบคุมโรคได้ดีที่สุด (Dalmacio *et al .,* 1990) การป้องกันกำจัดเชื้อ *R. solani* โดยการใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืชบางครั้งอาจทำให้เชื้อเกิดการต้านทาน ดังนั้นการศึกษาการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อให้เกษตรกรใช้สลับเพื่อป้องกันการดื้อยาของเชื้อสาเหตุ

การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช

ไส้เดือนฝอยรากปม (Root-knot nematodes: *Meloidogyne* spp.) มีพืชอาศัยมากกว่า 2,000 ชนิด แพร่ระบาดและทำลายพืชปลูกหลายชนิดในประเทศไทย เช่น พริก, มะเขือเทศ มันฝรั่ง ปทุมมา และฝรั่ง เป็นต้น โดยไส้เดือนฝอยรากปมชนิดที่สำคัญ คือ *M. incognita* และ *M. javanica* แนวทางการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม นอกจากการเขตกรรมและการใช้สารเคมีแล้ว การใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมแบบชีววิธีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ เชื้อแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* เป็นหนึ่งในศัตรูธรรมชาติที่มีการศึกษามาเป็นระยะเวลานาน และพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Gowen *et al*., 2008) *Pasteuria* spp. เป็นแบคทีเรียปรสิต ที่สร้างเอ็นโดสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นปรสิตที่ต้องเจริญเติบโตในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เพื่อการครบวงชีวิต (obligate parasite) การจำแนกชนิดของ *Pasteuria* spp. ปัจจุบันยังไม่ชัดเจนแต่มีการแบ่งออกอย่างคร่าวๆ ออกเป็น 6 สปีชีส์ คือ *P. ramosa* เป็นปรสิตของ water flea (*Daphnia magna*) *P. thornei* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากแผล *Pratylenchus penetrans P. nishizawae* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Heterodera* และ *Globodera* spp. *P. usage* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย *Belonolaimus longicaudatus P. hartismeri* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *M. ardensis* สำหรับ *P. penetrans* เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. (Gowen *et al*., 2008) Chen and Dickson (1998) ได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับ *P. penetrans* ทั้งประวัติของแบคทีเรียชนิดนี้ รวมทั้งชีววิทยา นิเวศวิทยา และการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมแบบชีววิธี *P. penetrans* เข้าทำลายไส้เดือนฝอย โดยสปอร์ที่อยู่ในดินจะเกาะติดกับผนังลำตัวของตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอย เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าทำลายรากพืช และเริ่มชักนำเซลพืชเพื่อสร้างแหล่งอาหาร (feeding site) สปอร์ของ *P. penetrans* จะสร้าง germ tube แทงผ่านผนังลำตัวและพัฒนาเป็น dichotomous septate mycelium ในช่องว่างภายในลำตัวของไส้เดือนฝอย ต่อมา mycelium จะเข้าสู่ระยะ sporogenesis และสุดท้ายจะพัฒนาเป็น single sporangia ที่มี endospore อยู่ภายใน การสร้างสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอย จะทำลายการสร้างไข่ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ ในระยะยาวจะทำให้ประชากรของไส้เดือนฝอยในดินลดลง ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเมื่อถูกสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะอยู่ที่ผนังลำตัวจำนวนมาก จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการเข้าทำลายรากพืชลดลง (Sano and

Gaspard, 1995; Adiko and Gowen, 1999) มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมของ *P. penetrans* ในพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ พริก ยาสูบ กระเจี๊ยบ องุ่น และข้าวสาลี เป็นต้น (Chen and Dickson, 1998) เอ็นโดสปอร์ของ *P. penetrans* สายพันธุ์ P20 จำนวน 10,000 สปอร์ต่อดิน 1 กรัม สามารถควบคุมไส้เดือนฝอย *M. arenaria* race1 ในถั่วลิสงได้ (Chen *et al*., 1996) สปอร์จำนวนน้อยของ *P. penetrans* ในดิน สามารถเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ (Chen *et al*., 1996; Oostendrop *et al*., 1991) ในการทดลองในกระถางพบว่า *P. penetrans* สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่า 100 เท่า ภายใน 2-3 รอบของการปลูกพืช (Ali *et al*., 2005)

ในประเทศไทยยังไม่มีการรวบรวมแบคทีเรีย *P. penetrans* และยังไม่มีการศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียชนิดนี้ในการใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของแบคทีเรียชนิดนี้ที่เป็น obligate parasite ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยอาศัยในการครบวงชีวิต ทำให้การผลิตแบคทีเรียชนิดนี้ในปริมาณมากทำได้ยากและมีต้นทุนสูงจึงไม่เป็นที่สนใจ อย่างไรก็ตามมีรายงานการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการ (Hewlett *et al*., 2002) และมีการทดสอบ *P. penetrans* ที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในแปลงทดลอง (Hewlett *et al*., 2006) ปัจจุบันมีการผลิตสปอร์ของ *Pasteuria* เป็นการค้าโดยบริษัท Pasteuria Biosciences ซึ่งคาดว่าในอนาคตอาจมีการนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย จึงควรรวบรวม *Pasteuria* สายพันธุ์ในประเทศไทย ก่อนที่จะมีการนำเข้าสายพันธุ์จากต่างประเทศมาใช้ ซึ่งจะทำให้การค้นหา *Pasteuria* สายพันธุ์ไทยทำได้ยากขึ้น *Pasteuria* สายพันธุ์ไทยอาจมีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยได้ดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ เนื่องจาก *P. penetrans* เป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไส้เดือนฝอยอาศัยสูง ดังนั้น *P. penetrans* สายพันธุ์ไทยอาจใช้ควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยของไทยได้ดีกว่าสายพันธุ์จากต่างประเทศ

ไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus* spp. เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูพืชที่สำคัญ ที่แพร่กระจายอยู่ทั่วโลกและทำความเสียหายแก่พืชหลายชนิด พืชที่ไส้เดือนฝอยชนิดนี้ทำความเสียหายมากได้แก่ ฝ้าย ชา ยาสูบ ถั่วเหลือง สับปะรด มันเทศ กล้วย พืชผัก และไม้ผลหลายชนิด (Robinson *et al*., 1997) ในประเทศไทยพบไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. ในตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชหลายชนิด เช่น ท้อ สับปะรด น้อยหน่า ละมุด กล้วย ฝรั่ง ลิ้นจี่ ลำไย องุ่น เงาะ มะละกอ ส้มโอ กาแฟ ทุเรียน ชมพู่ มังคุด ถั่วเหลือง ฝ้าย ผักบุ้ง มะเขือเทศ หม่อน หมาก ยาสูบ ถั่วเขียว แรดดิช ละหุ่ง มะเขือเปราะ ถั่วต่างๆ และกะหล่ำปลี (Chunram, 1972) ไส้เดือนฝอย *R. reniformis* จำนวน 5,000 10,000 20,000 และ 40,000 ตัวสามารถทำให้ผลผลิตถั่วเขียวลดลง 8.79 17.94 39.04 และ 43.02 เปอร์เซ็นต์ (สมควร และคณะ, 2538) และน้ำหนักเมล็ดแห้งของทานตะวันลดลง 16.95 17.75 27.10 และ 33.60 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองสภาพกระถางในเรือนทดลอง (สมควร และคณะ, 2537) สาโรจน์ (2517) ทดสอบประชากร *R. reniformis* ที่เข้าทำลายพลู พบว่าไส้เดือนฝอยชนิดนี้มีพืชอาศัย 39 ชนิด จากพืชที่นำมาทดสอบจำนวน 60 ชนิด มนตรีและจรัส (2534) รายงานว่าความเสียหายของผลผลิตพริกพันธุ์ห้วยสีทน-1 เพิ่มมากขึ้นในดินปลูกที่มีไส้เดือนฝอย 2 ชนิดคือ *R. reniformis* และ *M. incognita* อยู่ร่วมกัน เมื่อเทียบกับดินที่มีไส้เดือนฝอยเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มจึงมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และการควบคุมประชากรไส้เดือนฝอยเพื่อเพิ่มผลผลิตเป็นสิ่งจำเป็น

การควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม *Pasteuria* เป็นแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์กับไส้เดือนฝอยหลายชนิด (Chen and Dickson, 1998) ข้อมูลของแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มมีน้อยมากเมื่อเทียบกับ *P. penetrans* ที่เป็นปรสิตของไส้เดือนฝอยรากปมที่มีการศึกษากันมาก (Chen *et al*., 1997) Ko *et al*. (1995) รายงานการเกาะของสปอร์ Pasteuria-like organism บนผนังลำตัวของ *R. reniformis* เป็นครั้งแรก แต่ไม่ได้รายงานการเข้าทำลายไส้เดือนฝอย ซึ่งในระยะแรกยังไม่แน่ใจว่าสปอร์ดังกล่าวใช่ *Pasteuria* spp. หรือไม่ จนกระทั่งมีการพิสูจน์การเข้าทำลายไส้เดือนฝอยของสปอร์ และการเปรียบเทียบลำดับ nucleotides ของยีน *spoIIAB*, *atpA*, *atpF* และ 16s rDNA ในเวลาต่อมา ซึ่งพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Pasteuria* spp. (Hewlett *et al*., 2009) การศึกษาการเข้าทำลายไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มของ *Pasteuria* spp. โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างสปอร์และครบวงชีวิตได้ในตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวเต็มวัยเพศเมีย (Schmidt *et al*., 2010) *Pasteuria* spp. เป็น obligate parasite ซึ่งต้องการไส้เดือนฝอยอาศัยในการครบวงชีวิต ทำให้มีข้อจำกัดในการผลิตเชิงการค้า จนกระทั่งมีรายงานว่าสามารถผลิตสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้ในถังหมักเป็นผลสำเร็จ (Hewlett *et al*., 2002) และได้ใช้วิธีนี้ผลิตสปอร์ของ *Pasteuria* spp. สำหรับควบคุมไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถผลิตเป็นการค้าในรูปแบบเมล็ดพันธุ์ที่เคลือบด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย หรือรูปแบบการปั้นเม็ด ซึ่งจากการทดสอบเบื้องต้นพบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอย *R. reniformis* (Schmidt *et al*., 2010) ปัจจุบันในประเทศไทยยังไม่มีการรวบรวม *Pasteuria* spp. ของ *Rotylenchulus* spp. แต่มีการรวบรวม *P. penetrans* แบคทีเรียปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp. โดยกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ซึ่งสามารถรวบรวมได้หลายไอโซเลต และอยู่ระหว่างการคัดเลือกไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพ (Khaithong *et al*., 2012) การทดลองนี้เป็นการสำรวจหาแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ที่มีความจำเพาะกับ *Rotylenchulus* spp. เพื่อนำมาใช้ในการควบคุมไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp.

การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

Sclerotium rolfsii Sacc. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน (soilborne) เป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน (damping off) ของกล้าพืช และโรครากเน่าและโคนเน่าของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรคลำต้นเน่าของถั่วลิสง โคนเน่าของมะเขือเทศ โคนเน่าของพริก เน่าคอดินของฝ้าย เน่าระดับดินของถั่วฝักยาว เน่าแห้งของกล้วยไม้ รากเน่าของเยอบีร่า ลำต้นเน่าของทานตะวัน หัวและรากเน่าของหอม กระเทียม และต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ Aycock, (1966) รายงานถึงความเสียหายของผลผลิตถั่วลิสงที่ปลูกในพื้นที่ราบทางตอนใต้ของรัฐ North Carolina ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1959 ว่ามีความเสียหาย 1-60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นมูลค่า10-20 ล้านดอลลาร์ และปัจจุบันปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าของพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *S. rolfsii* ยังคงเป็นปัญหาที่รุนแรงและสำคัญในเขตภาคเหนือตอนบน สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรากันอย่างแพร่หลาย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพืช อย่างไรก็ดี การใช้สารเคมีที่ไม่จำเพาะต่อเชื้อสาเหตุ ทำให้การป้องกันหรือกำจัดไม่มีประสิทธิภาพอย่างเต็มที่ ส่งผลต่อการใช้สารเคมีในปริมาณที่มากเกินความจำเป็น ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังทำลายสภาพแวดล้อมรวมไปถึงสุขภาพของมนุษย์และสัตว์อีกด้วย (Chutima, 2008)

เชื้อราสกุล *Sclerotium* จัดอยู่ใน Form-Class Hyphomycetes (Hyphales) Form-Order Agonomycetales (Mycelia Sterilia) Form-Family Agonomycetaceae มีหลายชนิด (species) เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืช เช่น *Sclerotium cepivorum S. rolfsii S. tuliparum S. delphinii* และ *S. wakkeri* เป็นต้น (Von,1981)

S. rolfsii เป็นเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ดำรงชีวิตอยู่ในดิน (soilborne) เป็นสาเหตุโรคเน่าระดับดิน (damping off) ของกล้าพืช และโรครากเน่าและโคนเน่าของพืช มีพืชอาศัยมากกว่า 500 ชนิด Farr *et. al*.(1989) รายงานว่ามีพืชมากกว่า 270 สกุล ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่เป็นพืชอาศัยของ *S. rolfsii* พืชที่อ่อนแอต่อเชื้อรา *S. rolfsii* เช่น มันเทศ (Sweet potato) ฟักทอง (Pumpkin) ข้าวโพด (Corn) ข้าวฟ่าง (Wheat) ถั่วลิสง (Peanut) นาซีซัส (Narcissus) ไอริส (Iris) ลิเลี่ยม (Lilium) บานชื่น (Zinnia) และเบญจมาศ (Chrysanthemum) เป็นต้น

ลักษณะของรา *S. rolfsii* คือ สร้างเส้นใยสีขาวหรือสีอ่อน มี clamp connection เจริญได้รวดเร็ว และสร้าง sclerotium มีลักษณะเป็นเม็ดกลม สีน้ำตาล ประกอบด้วยเส้นใยอัดตัวกันเป็นชั้นหลายชั้น และเป็นเนื้อเยื่อแบบ pseudoparenchyma ปัจจุบันพบ perfect state จัดอยู่ใน subdivision Basidiomycotina คือ รา *Athelia rolfsii* (Barnett ,1987 ; วิจัย, 2546)

สำหรับในประเทศไทยรา *S. rolfsii* เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ โรคลำต้นเน่าของถั่วลิสง โคนเน่าของมะเขือเทศ โคนเน่าของพริก เน่าคอดินของฝ้าย เน่าระดับดินของถั่วฝักยาว เน่าแห้งของกล้วยไม้ รากเน่าของเยอบีร่า ลำต้นเน่าของทานตะวัน หัวและรากเน่าของหอม กระเทียม และต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์ (สุณีรัตน์, 2551) ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาอย่างมากในการนำเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ มาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี ซึ่งสามารถเพิ่มความแข็งแรง ความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืชได้ดี (Belanger,1996) Suslow (1982) รายงานว่าจุลินทรีย์ควบคุมโรคสามารถใช้แทนการใช้สารเคมีในกรณีที่ไม่สามารถใช้สารเคมีหรือมีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม อีกทั้งจุลินทรีย์สามารถเพิ่มปริมาณและคงทนอยู่ในดินในระยะเวลาที่ยาวนานกว่าสารเคมี

การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี (biological control) ได้มีผู้ให้คำจำกัดความของคำนี้แตกต่างกัน แต่อาจสรุปโดยรวมได้ว่าหมายถึง การลดปริมาณเชื้อสาเหตุของโรคหรือลดกิจกรรมการก่อให้เกิดโรคของเชื้อสาเหตุของโรคหรือปรสิตที่อยู่ในระยะที่มีปฏิกิริยา โดยการใช้สิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งหรือมากกว่ามาใช้ในการควบคุม และอาจรวมถึงการใช้สารพันธุกรรม (gene หรือ gene product) จากสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นด้วย ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ไม่รวมถึงมนุษย์ (Cook and Baker, 1983; Cook, 1985)

Chanway (1998) กล่าวถึงเชื้อราเอ็นโดไฟท์ว่า คือเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในพืช โดยไม่ทำให้พืชเกิดโรคและมีความสัมพันธ์แบบ mutualistic sysmbiosis เชื้อราเอ็นโดไฟท์บางชนิดสร้างสารประกอบบางอย่างหรือปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ระหว่างเชื้อรากับพืชอาศัย ทำให้เนื้อเยื่อพืชลดความดึงดูดต่อพวก herbivores และบางสายพันธุ์กระตุ้นให้พืชเกิดความต้านทาน ส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช ในทางกลับกันเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ได้รับประโยชน์จากพืชโดยอาศัยสารต่างๆจากพืช และ

ดำรงชีวิตอยู่ภายในต้นพืช นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ บางสายพันธุ์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชได้ และสามารถใช้เป็น biological control agents โดยเป็นปฏิปักษ์ต่อ microbial pathogens หรือกระตุ้นให้เกิดความต้านทางแบบ systemic ได้

Clay (1989) ได้รายงานว่า การทดลองในโรงเรือนนั้นเอนโดไฟท์ยังช่วยเพิ่มอัตราการงอกของเมล็ด และความแข็งแรงของต้นกล้าด้วย

ในการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ต้องอาศัยความรู้ทางด้านชีวเคมี ทราบลักษณะและคุณสมบัติทางกายภาพของพืช ประกอบการมีเทคนิคและวิธีการสุ่มตัวอย่างที่ดี จึงจะทำการแยกได้ชนิดและจำนวนตามความต้องการ นอกจากนี้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้ส่วนมากจะไม่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เพราะการจะเกิดโรคได้นั้นต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัย เชื้อสาเหตุ และสภาพแวดล้อม (Sinclair, 1991)

Umali *et al* (1999) กล่าวว่า เวลาที่ใช้ในการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการฆ่าเชื้อที่ผิวยิ่งนานจะทำให้ใบยิ่งซีดจางจนเนื้อเยื่อตายและทำให้ได้เชื้อราจำนวนน้อย

Baker and Cook (1974) ได้กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้านนั้นจะมีกลไกการเข้าทำลาย 3 ขบวนการ คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันซึ่งกันและกัน และการเป็นปรสิตกับอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งในการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจให้ผลที่แตกต่างไปจากในสภาพโรงเรือนได้

Gasoni *et al.* (1993) ศึกษาและแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (nonpathogenic sterile fungus) จาก alfalfa และ alfalfa soil เพื่อใช้ในการควบคุมโรค damping off ของต้น flax ที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* พบว่าสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อราสาเหตุของโรคได้ดี เมื่อทำการปลูกด้วยเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ก่อนการปลูก เพื่อให้พืชพัฒนา defense mechanism

พิภพ และคณะ (2544) แยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากพืชสมุนไพรไทยจำนวน 13 ชนิดจากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดใกล้เคียงได้เชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 1206 ไอโซเลท โดยแยกได้จากดีปลี 395 จักค่าง 149 มะกรูด 119 พญายอ 105 ทองพันชั่ง 88 มะแขว้งขม 82 ผักปลัง 49 ชาสตูล 45 คาวตอง 43 ลิ้นงูเห่า 41 เสลดพังพอน 27 ผักแปบ 22 ไอโซเลท พืชสมุนไพรที่มี colonization rate สูงได้แก่ ชาสตูล ผักแปบ และเสลดพังพอน และนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *Colletotrichum capcisi* สาเหตุโรคกุ้งแห้ง โดยวิธี dual culture พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ Mycelia sterilia 9 ที่แยกได้จากมะกรูดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด คือ 57 เปอร์เซ็นต์

จิตรา และคณะ (2550) ศึกษาและทำการแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากพืชสมุนไพร 13 วงศ์ 15 ชนิด ได้จำนวน 210 ไอโซเลท ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Colletotrichum, Pestalotiopsis, Phyllosticta, Phoma* และ *Phomopsis* ตามลำดับ และนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้จำนวน 7 ชนิดมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคพืช 10 ชนิด พบว่า เชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่เจริญช้าและไม่สร้างสปอร์จำนวน 5 ไอโซเลท และรา *Pestalotiopsis* sp. 1ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *Alternaria alternata, Bipolaris maydis, Lasiodiplodia theobromae, Phytophthora palmivora* และ *Sclerotium rolfsii* ในห้องปฏิบัติการ

Rafaeli *et al.* (2009) แยกและคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จากสมุนไพร comfrey (*Symphytum officinale* L.) เพื่อใช้ในการควบคุมเชื้อรา *Sclerotinia sclerotiorum* สาเหตุโรคพืช ซึ่งนำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 12 ไอโซเลทมาทำการทดสอบโดยวิธี dual cultute พบว่าเชื้อราเอ็นโดไฟท์ จำนวน 4 ไอโซเลท ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. sclerotiorum* ได้ 46.7 – 50.0 เปอร์เซ็นต์

Paul and Richard (2008) ให้ความเห็นว่า ในอนาคต การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ และการใช้สารเคมีจะมีวิธีการใช้ที่ผสมผสานกัน เช่น การจำหน่ายเมล็ดพันธุ์เชิงการค้า จะมีการคลุกเมล็ดด้วยเชื้อจุลินทรีย์เอ็นโดไฟท์ ร่วมกับการใช้สารเคมี เพื่อกระตุ้นประสิทธิภาพระหว่างสารและให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิดโรคแบบหลากหลาย biological agent จะกลายเป็นส่วนหนึ่งในระบบการผลิตพืช ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตพืชและปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

ในปัจจุบันพืชผลทางการเกษตรมีสารเคมีตกค้างทำให้มีผลต่อสภาพแวดล้อมและสุขภาพของผู้บริโภค การนำจุลินทรีย์เข้ามาควบคุม กำจัด ศัตรูพืช เช่น แมลง และ โรคพืช นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีบทบาทในการทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช (กองกีฏและสัตววิทยา, 2537)ในประเทศไทยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมทางชีววิธี (Biological control) เช่น เชื้อรา *Chaetomium* sp. (เกษม, 2533) และ *Trichoderma* sp. (จิระเดช และคณะ, 2535) ถูกนำมาใช้ควบคุมโรคพืชโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อราศัตรูพืช ส่วนโรคพืชที่เกิดจากไส้เดือนฝอย ยังมีการศึกษาวิจัยกันน้อย ถึงเชื้อราที่เป็นปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยศัตรูพืช (Plant-parasitic nematodes)โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไส้เดือนฝอยรากปมซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยที่มีการระบาดมากที่สุด และมีพืชอาศัยมาก ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมี วัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยรากปมแล้วนำไปทดสอบศักยภาพ ในการควบคุม พร้อมทั้งพัฒนากรรมวิธีเพื่อการผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์(Bio-nematicide product) ต่อไป

ไส้เดือนฝอยรากปม(Root-knot nematode; Meloidogyne *spp*.) เป็นไส้เดือนฝอยที่พบแพร่หลายในหลายจังหวัดและมีพืชอาศัยมากที่สุด (มากกว่า 2,000 ชนิด) เมื่อเปรียบเทียบกับไส้เดือนฝอยชนิดอื่น พืชอาศัยที่ถูกทำลายเสียหายมากได้แก่ พืชตระกูลมะเขือ เช่น พริก มะเขือเทศ มะเขือเปราะ พืชตระกูลแตง พืชตระกูลกะหล่ำ พืชตระกูลถั่ว ขิง ฝรั่ง มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง ยาสูบ พริกไทย และไม้ดอกไม้ประดับหลายชนิด ลักษณะอาการ รากพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยรากปมทำลายจะบวมและพองออก มักจะเกิดเป็นปมที่ปลายราก รากพืชไม่งอกยาวต่อไป พืชที่ถูกทำลายในระยะกล้าต้นจะแคระแกรน (มนตรี, 2538)

เชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยเป็นกลุ่มของเชื้อราที่สามารถเข้าทำลายและเป็นปรสิตของไส้เดือนฝอย (Nematophagous fungi) มีทั้งที่เป็นปรสิตของไข่และตัวอ่อนของไส้เดือนฝอย เชื้อราที่สร้างโครงสร้างขึ้นมาดักจับไส้เดือนฝอยเป็นอาหาร แม้กระทั่งเป็น endoparasites โดยใช้ สปอร์ทำลายไส้เดือนฝอย ด้วยเหตุนี้จึงมีการพัฒนาศักยภาพของเชื้อราเหล่านี้ให้เป็น biocontrol agents ควบคุมไส้เดือนฝอยศัตรูพืช Jansson and Lopez-Llorco (2001) ได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามกลไกการเข้าทำลายของเชื้อดังนี้

กลุ่มที่เป็นกลุ่มเชื้อราที่สร้างโครงสร้างไว้ดักจับไส้เดือนฝอย ซึ่ง Barron (1977) แบ่งโครงสร้างต่างๆดังนี้ เช่น *Stylopage* spp. *Cystopage* spp. *Monacrosporium cionopagum* *M. ellipsosporum* และ *Arthrobotrys oligospora* *Arthrobotrys dactyloides* และ *Dactylella leptospora*

กลุ่มที่ 2 Endoparasitic fungi เชื้อราในกลุ่มนี้ต้องอาศัยการการเจริญภายในตัวของไส้เดือนฝอย และมีข้อจำกัดในการเจริญในดิน โดย Kerry and Jaffee (1997) เช่นเชื้อราที่เข้าทำลายไส้เดือนฝอยโดยการสร้างสปอร์เข้าจับกับผนังลำตัวของไส้เดือนฝอย เช่น *Hirsutella rhossiliensis Drechmeria coniospora* และ*Verticillium* spp.

กลุ่มที่ 3 Egg and female-parasites เป็นปรสิตของ ไข่ และ ตัวอ่อนระยะที่สองของ ไส้เดือน -ฝอย ซึ่งจากรายงานของ เชื้อราในกลุ่มนี้มีอยู่ทั่วไปในดินและสามารถแยกเชื้อได้จากไข่ ไส้เดือนฝอย *Heterodera*, *Globodera* และ *Meloidogyne* และยังคงสามารถอยู่ในดินได้แม้ว่าไม่มีไส้เดือนฝอย เช่น *Acremonium*, *Cylindrocarpon*, *Fusarium*, *Paecilomyces* และ *Verticillium chlamydosporium* (Kerry and Jaffee, 1997)

กลุ่มที่ 4 Toxin-producing fungi เป็นกลุ่มของเชื้อราที่สร้าง mycotoxin ทำให้ไส้เดือนฝอย ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น *Pleurotus* sp. และ *Coprinus* sp. Barron (1977)
การวิจัยนี้จะรวบรวมเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยในประเทศไทยซึ่งคาดว่าน่าจะมีหลายชนิดและเป็นศักยภาพที่รอการค้นหาและพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ต่อไป

Fusarium เป็นราอาศัยในดิน พบได้ทั่วไปทุกแห่ง หลายชนิดเป็นสาเหตุของโรคพืชที่สำคัญ ซึ่งระบาดทำความเสียหายแก่ พืชไร่ พืชหัว พืชผัก ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้ผลทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โรคสำคัญในต่างประเทศที่เกิดจากรา *Fusarium* และทำความเสียหายมาก ได้แก่ โรคเหี่ยวในกล้วย (Panama wilt) โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ พริก ปอ (flax) ฝ้าย ถั่วลิสง ถั่วเหลือง ถั่วลันเตา หัวหอม มันฝรั่ง กล้วย ส้ม และ แอปเปิล ในประเทศไทยพบราสกุลนี้หลายชนิด กระจายอยู่ทั้งในดิน และในพืชมากกว่าราชนิดอื่น โดยเป็นสาเหตุของโรคในพืชที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ ธัญพืชเมืองหนาว ฝ้าย ถั่วลิสง หัวหอม กะหล่ำปลี แตงโม มะเขือเทศ พริก ถั่วฝักยาว และ มันฝรั่ง โดยทำให้เกิดโรคเหี่ยว (Fusarium wilt disease) กับพืชล้มลุก และพืชผักหลาย ๆ ชนิด และโรคผลเน่า (Fusarium fruit rot) ที่ทำมีการระบาดทำความเสียหายให้กับผลผลิตพืชเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะพืชตระกูลแตง เนื่องจากเชื้อรามีพืชอาศัยจำนวนมากและสามารถดำรงชีพอยู่ในดินได้นานหลายปี เกิดความผันแปร (variation) ได้ง่าย และ เชื้อรานี้หลายชนิดมีการสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อพืชและสิ่งมีชีวิตที่บริโภคพืชที่มีเชื้อรา *Fusarium* ปนเปื้อน ปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชเศรษฐกิจหลายชนิดมากขึ้น เช่น โรคตายพรายของกล้วย ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* โรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* และโรคเหี่ยวที่เกิดกับพืชตระกูลแตง ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *melonis* เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืชในการป้องกันกำจัดหรือควบคุมการระบาดของเชื้อราสาเหตุโรคแล้วก็ตาม แต่ก็ยังไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อรา เป็นเชื้อราที่อาศัยในดิน และมีการอยู่รอดในเศษซากพืชข้ามฤดูได้ ทำให้การใช้สารเคมียังไม่ได้ผลดี คุ้มค่ากับค่าใช้จ่ายที่เสียไป แต่กลับทำให้เสียเงินลงทุนทำการเกษตรมากขึ้น ในขณะที่ราคาผลผลิตเกษตรยังคงตกต่ำอยู่ตลอด

จากปัญหาดังกล่าว ที่สอดคล้องกับการระบาดและเข้าทำลายของเชื้อรากลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxyspotum* ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น มีต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเนื่องหลังการใช้ ทดแทนการใช้สารเคมีที่อาจตกค้างหรือมีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมได้ ปัจจุบันในต่างประเทศมีรายงานการศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxyspotum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืช โดยเฉพาะในมะเขือเทศโดยการใช้เชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *F. oxysporum*) จากการเก็บรวบรวมเชื้อจากดินในธรรมชาติมากขึ้น โดยสามารถยับยั้งการ

เจริญของเชื้อราสาเหตุของโรคที่อาศัยอยู่ในดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของพืชอาศัย

Benhamou และคณะ (2002) ศึกษาอิทธิพลของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค สายพันธุ์ Fo47 (nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47) ในการกระตุ้นให้เซลล์เนื้อเยื่อของแตงกวาสร้างระบบการปกป้องตัวเองจากการเข้าทำลายของเชื้อรา *Pythium ultimum*

Da Silva และคณะ (2005) ศึกษาผลของ เชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium oxysporum*) จำนวน 9 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici,* race 2 พบว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค มีประสิทธิภาพในการลดความรุนแรงของโรค และทำให้พืชเจริญพัฒนาได้ในระดับปกติ

Forsyth และคณะ (2006) ศึกษาพบว่าเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 2 ไอโซเลท ที่แยกได้จากดินบริเวณรากของกล้วย มีความสามารถในการลดความรุนแรงของโรคเหี่ยวเนื่องจากเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ในกล้วยสายพันธุ์ Lady Finger และ สายพันธุ์ Cavendish cultivars ในสภาพการปลูกแบบโรงเรือนได้

Larkin (1996) ศึกษาพบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* ไอโซเลทที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (noo-pathogenic *F. oxysporum*) แสดงผลการยับยั้งการเกิดโรคได้ เมื่อใส่สปอร์ผนังหนา หรือ คลามายโดสปอร์ (chlamydospores) ลงในดินปลูกอย่างน้อย 50 – 100 คลามายโดสปอร์ต่อน้ำหนักดิน 1 กรัม และพบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (noo-pathogenic *F. oxysporum*) หลาย ๆ ไอโซเลทที่แยกได้จากดินที่มีผลกระทบ (suppressive soil) ต่อการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงโม มีศักยภาพในเป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* สาเหตุของโรคได้ (biocontrol agents).

Nel และคณะ (2006) ศึกษาพบว่า เชื้อรา Trichoderma *และ เชื้อรา* F. oxysporum *ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic* F. oxysporum*) จากตัวอย่างดินต่าง ๆ ในแอฟริกาใต้ สามารถยับยั้งการเกิดโรคตายพรายของกล้วยในโรงเรือนทดลองได้ โดยเชื้อรา* F. oxysporum *ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic* F. oxysporum*) จำนวน 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเกิดอาการโรคตายพรายในกล้วยได้ 87·4 และ 75·0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ*

จากรายงานการศึกษาที่ได้ผลดีดังกล่าว จึงเป็นประเด็นที่น่าศึกษาวิจัยเก็บรวบรวม ทดสอบและคัดเลือกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *F. oxysporum*) ในดินธรรมชาติ ดินบริเวณรากพืชอาศัย หรือในดินที่มีผลกระทบหรือยับยั้งการพัฒนาของโรค (suppressive soil) มาใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยว ซึ่งในต่างประเทศได้มีรายงานการศึกษาเอาไว้มากมายเกี่ยวกับปัจจัย หรือจุลินทรีย์ที่มีอิทธิพลในการชักนำหรือยับยั้งการเกิดโรค (suppressive soil) ผลการศึกษาที่ได้ผลดี สามารถนำมาจัดระบบการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* ร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F.oxysporum* ตามวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์เชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีศักยภาพในการควบคุมประชากรของเชื้อรา *F. oxysporum* ซึ่งคาดว่าผลการศึกษาและข้อมูล รวมถึงผลสรุปที่ได้ จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในการป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพื่อสร้างระบบเกษตรกรรมของประเทศไทยให้ยืนยง และยั่งยืนสืบต่อไป

ราในสกุล *Alternaria* จัดเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น โรคใบจุดสีม่วงในพืชตระกูลหอมกระเทียม โรคใบจุดในผักกะหล่ำ พัฒนา และคณะ (2526) รายงานว่าเชื้อรา *Alternaria brassicae, Alternaria brasicicola* ทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชในตระกูลกะหล่ำ คือ ผักคะน้าจีน ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียวกวางตุ้ง กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก กะหล่ำปม บร๊อกโคลี่ *Alternaria porri* ทำให้เกิดโรคใบจุดม่วงหรือใบไหม้กับพืชพวกหอมแบ่ง หอมใหญ่ นิตยา (2545) รายงานว่าโรคใบจุดสีม่วงหรือโรคแผลสีม่วง เป็นโรคที่สำคัญที่แพร่ระบาดและสร้างความเสียหายรุนแรงกับพืชในสกุลหอมกระเทียมมากที่สุดโรคหนึ่ง โดยมีรายงานพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1879 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยพบโรคใบจุดสีม่วงเกิดกับกระเทียมต้นหรือ leekและระบาดกับหอมหัวใหญ่ทำความเสียหายอย่างรุนแรงในอินเดีย ในประเทศไทยพบระบาดในฤดูหนาว เนื่องจากเป็นช่วงที่มีอากาศหนาวเย็นและมีน้ำค้างลงจัดเวลากลางคืนเหมาะกับการแพร่ระบาดของโรค หอมและกระเทียมที่ปลูกในฤดูหนาวพบเป็นโรคดังกล่าวรุนแรงเสมอ เกิดจากเชื้อ *Alternaria porri* นุชนารถ (2546) ได้รายงานโรคใบจุดออลเทอ (Alternaria leaf spot) มีพืชอาศัยได้แก่ ผักกาดหอมห่อ กะหล่ำปม กะหล่ำดาว ผักกาดฮ่องเต้ คะน้ายอด ผักกาดขาวปลี ผักกาดหางหงษ์ หอมญี่ปุ่น เบบี้แครอท มะเขือเทศ พริกหวาน

จากการที่ราในสกุล Alternaria จัดเป็นเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพื่อให้ได้วิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราสกุล Alternaria ที่มีประสิทธิภาพ ในปัจจุบันการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืชได้มีการพัฒนาการอย่างต่อเนื่อง มีการผลิตสารใหม่ๆ มากมายหลายชนิด ส่วนใหญ่เพื่อการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น มีความปลอดภัยต่อผู้ใช้สูงขึ้น แต่ก็มีการศึกษาถึงการใช้ชีวินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาถึงชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพป้องกันกำจัดเชื้อราสกุล Alternaria สาเหตุโรคพืชด้วย ได้เคยมีรายงานถึงการใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ว่าสามารถใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria* ในผักที่ปลูกโดยไม่ใช้ดิน แต่การศึกษายังไม่ชัดเจนถึงรายละเอียดต่างๆ จึงสมควรที่จะได้มีการศึกษา เพื่อแนะนำเป็นทางเลือกให้กับเกษตรกรต่อไป

เห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. บางชนิดสามารถนำมาใช้รับประทานเป็นอาหารได้ บางชนิดมีคุณสมบัติในการควบคุมการเจิญของเชื้อสาเหตุโรคทั้งในพืชและในมนุษย์ สามารถพบเห็ดในสกุลนี้ได้พบได้ทั้งในเขตร้อนชื้นและเขตอบอุ่นบนรากต้นไม้ที่เน่าผุ ในประเทศไทยมีการพบเห็ดในสกุลนี้บางชนิดในเขตจังหวัดนราธิวาส ตากและเลย (อัจฉรา, 2545) มีรายงานว่าสารประกอบที่ได้ส่วน fruiting body ของเห็ดในสกุลนี้สามารถลดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Sphaerotheca fuliginea* สาเหตุโรคราแป้งแตงกวาได้ถึง 20% นอกจากนี้ยังลดอัตราการงอกของโคนีเดียได้ถึง 71% ภายใน 48 ชั่วโมงหลังการปลูกเชื้อ (Stadnik *et al*., 2003) นอกจากนี้เห็ดบางชนิดในสกุลนี้ เช่น *O. radicata*, *O. canarii* และ *O. mucida* ยังสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในมนุษย์ (Denisova, 2001; Reshetnikos *et al*., 2001; Vahidi and Namjoyan, 2004) และดังนั้นการศึกษาหาชนิดเห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. ที่สามารถสร้างสารประกอบที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคพืช จึงมีความจำเป็นเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดในสกุล *Oudemansiella* spp. ที่มีศักยภาพสำหรับการนำมาใช้เป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมโรคพืช เพื่อลดความเสียหายของพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค และเป็นการลดการใช้สารเคมีควบคุมโรคอีกทางหนึ่ง

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เห็ด *Oudemansiella* spp. ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชในสภาพห้องปฏิบัติการ และหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการอบแห้งเส้นใยเห็ดก่อนนำมาสกัดสารประกอบด้วยตัวทำละลาย สำหรับเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาการนำสารประกอบจากเห็ด *Oudemansiella* spp. มาใช้ป้องกันกำจัดจุลินทรีย์เชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธีอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

เชื้อราในกลุ่ม *Alternaria* spp. เช่น *Alternariabrassicae*, *A. brassicicola*, *A. porri*และ *A. solani*เป็นเชื้อสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชผัก เช่น คะน้า ผักกาดกะหล่ำ มะเขือเทศ (อรพรรณ, 2552) โรคใบจุดสีม่วงในพืชตระกูลหอมและกระเทียม (นิตยา, 2545) และไม้ดอก เช่น โรคใบจุดดำของกล้วยไม้ (นิยมรัฐ, 2544) เป็นต้น โดยพบอาการโรคเป็นแผลจุดวงกลมสีน้ำตาลซ้อนกันหลายชั้น เนื้อเยื่อรอบๆ แผลเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ขนาดของแผลมีทั้งเล็กและใหญ่ บนแผลมักจะมีเชื้อราชั้นบางๆ มองเห็นเป็นผงสีดำ สปอร์ของเชื้อสาเหตุสามารถปลิวไปได้ไกลๆ โดยไปตามน้ำ ลม แมลง สัตว์ เครื่องมือการเกษตร มนุษย์ และสามารถติดไปกับเมล็ดพันธุ์ ได้หรืออาศัยอยู่กับวัชพืชในแปลง

สารประกอบที่ได้จากการสกัดราในกลุ่ม *Oudermansiella*เช่น สาร oudemansin X และ mucidinสกัดจากเห็ด *O. radicata* (Anke and Werle, 1991) สารประกอบที่ได้จาก *O. canarii*มีฤทธิ์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคในคนทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย (Rosa *et al*., 2005) สาร oudemansinจาก *O. radicata*มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Penicilliumnotatum*และ *Alternariaporri* (Anke*et al*., 1990) และสารประกอบที่ได้จากการสกัดเชื้อราในกลุ่ม *Oudermansiella*บางชนิดสามารถยับยั้งการงอกของโคนีเดียเชื้อรา *Shpaerothecafuliginea*สาเหตุโรคราแป้งในแตงกวาได้ถึง 71% (Stadnik*et al*., 2003) และการสกัดเชื้อราในกลุ่ม *Oudermansiella*ด้วยตัวทำละลายต่างๆ เช่น เอธิลแอลกอฮอลหรือเอธิลอะซิเตรดและนำสารสกัดไปใช้กับเชื้อรา *Aspergillusniger*สามารถยับยั้งการงอกของโคนีเดียได้ (Vahidi and Namjoyan, 2004) ซึ่งสาร oudemansinนี้สามารถพบได้ใน fruiting body ของเห็ดสกุล Oudermansiellaทั้ง 2 ชนิดคือ *O. radicata*และ *O. mucida* (Anke*et al*., 1983)

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งถือว่าเป็นถิ่นกำเนิดของกล้วยหลายชนิด และมีการปลูกกล้วยหลายสายพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์ ใช้รับประทานเป็นอาหาร และเพื่อการค้าอยู่ทั่วไปตามภาคต่าง ๆ ของประเทศ พันธุ์กล้วยที่ปลูกกันทั่วไป คือกล้วยน้ำว้า ซึ่งถือว่าเป็นไม้ผลพื้นเมืองของไทยที่มีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้หลายชนิด แต่การปลูกกล้วยน้ำว้ามักประสพปัญหาโรคตายพราย (Fusarium wilt or Panama disease) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* ชนิดที่มีความจำเพาะในการเข้าทำลายพืชตระกูลกล้วย เช่น สกุล *Musa* และ สกุล *Heliconia* เชื้อราชนิดนี้ทำให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการผลิตกล้วยทั่วโลก โดยมีบันทึกครั้งแรกในออสเตรเลียเมื่อปี ค.ศ. 1876 ต่อมาในปี ค.ศ. 1890 พบโรคนี้บริเวณแถบทะเลแคริเบียนและเขตร้อนของทวีปอเมริกา นับตั้งแต่นั้นมาจนถึงปี ค.ศ. 1995 มีรายงานว่าโรคนี้ได้ทำความเสียหายแก่การผลิตกล้วยพันธุ์ต่าง ๆ ในทุกพื้นที่ปลูกกล้วยของโลก อาการของโรคตายพรายเริ่มจาก เชื้อราเข้าสู่รากแล้วเจริญเข้าไปอยู่ในท่อลำเลียงของเหง้า (rhizome) และลำต้นเทียม (pseudostem) ทำให้ท่อน้ำท่ออาหารเกิดอุดตันและเนื้อเยื่อเน่าเป็นสีน้ำตาล ระบบการส่งน้ำและแร่ธาตุอาหารผิดปกติ ใบจึงขาดน้ำ และแสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล ก้านใบหักพับลงมาขนานกับลำต้น ส่วนใบยอดนั้นยังคงมีสีเขียวอ่อนและเจริญตั้งตรงอยู่ การเจริญเติบโตหยุดชะงักไม่สร้างดอกและผล เนื้อเยื่อในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เมื่ออาการรุนแรงมากลำต้น

เทียมจึงล้มลง โดยทั่วไปมักไม่พบอาการภายนอกของโรคในส่วนของหน่อ (sucker) ที่มีความสูงน้อยกว่า 5 ฟุต และอายุไม่ถึง 4 เดือน แต่เมื่อหน่อเจริญเป็นต้นและถึงระยะแตกปลี อาการโรคจึงปรากฏขึ้น (Stover, 1972) เชื้อรามักแพร่กระจายไปกับน้ำและหน่อที่นำไปปลูก และ โรคมักจะเกิดกับกล้วยที่ปลูกในดินเหนียวที่ระบายน้ำไม่ดี

เชื้อราสาเหตุโรคตายพรายนี้จัดอยู่ใน formae speciales (f. sp.) หนึ่งของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่อาศัยและแพร่กระจายอยู่ในดินปลูกพืชทั่วทุกแห่งของโลก เชื้อรา *F. oxysporum* บางสายพันธุ์เป็นราอาศัยในดินที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืช แต่มีสายพันธุ์อีกจำนวนมากที่เป็นเชื้อสาเหตุทำให้เกิดอาการเหี่ยว (vascular wilt) ซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากกับพืชหลายชนิด เชื้อราสามารถอยู่รอดในดินได้ในรูปของเส้นใย (mycelium) หรือ สปอร์ผนังหนา (chlamydospore) แล้วเจริญเข้าทำลายพืชในฤดูปลูกต่อไปได้ ทำให้การใช้สารเคมีในการป้องกันการแพร่ระบาด และกำจัดเชื้อราสาเหตุของโรคตายพราย ยังไม่ได้ผลดี คุ้มค่ากับค่าใช้จ่ายที่เสียไป แต่กลับทำให้เสียเงินลงทุนทำการเกษตรมากขึ้น ในขณะที่ราคาผลผลิตเกษตรยังคงตกต่ำ เช่นปัจจุบัน

จากปัญหาดังกล่าว ที่สอดเนื่องกับการพบรายงานการระบาดและเข้าทำลายของเชื้อรากลุ่มนี้เพิ่มมากขึ้น จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ที่มีประสิทธิภาพดี ทดแทนการใช้สารเคมีที่ โดยต้นทุนต่ำ และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเนื่องหลังการใช้ ซึ่งปัจจุบันวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เริ่มเข้ามามีบทบาทมากขึ้นในวิธีการป้องกันกำจัดเชื้อราโรคพืช และจากการศึกษาค้นคว้าข้อมูลพบว่า

ปัญญรัตน์ สาลี (2536) ศึกษาพบว่า รา *Trichoderms hamatum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ โดยรา *T. hamatum* สามารถเจริญครอบคลุมโคโลนีของเชื้อรา และพบว่ารา *T. hamatum* เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร PDA+lactic acid (pH 4.5) ที่อุณหภูมิ 27-32 องศาเซลเซียส

Nel และคณะ (2006) ศึกษาพบว่า เชื้อรา Trichoderma และ เชื้อรา F. oxysporum ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic F. oxysporum) จากตัวอย่างดินต่าง ๆ ในแอฟริกาใต้ สามารถยับยั้งการเกิดโรคตายพรายของกล้วยในโรงเรือนทดลองได้ โดย เชื้อรา F. oxysporum ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (nonpathogenic F. oxysporum) จำนวน 2 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเกิดอาการโรคตายพรายในกล้วยได้ 87·4 และ 75·0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Pratella และ คณะ (1993) ศึกษาพบว่า เชื้อรา T. viride, T. harzianum, Gliocladium roseum และ Penicillium variotii สามารถป้องกันกำจัดเชื้อรา F. oxysporum สาเหตุโรคหัวเน่าในมันฝรั่งในระยะหลังการเก็บเกี่ยวได้เป็นอย่างดี

Thangavelu และคณะ (2003) ศึกษาพบว่า เชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากบริเวณรอบรากกล้วย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สาเหตุโรคตายพรายของกล้วยบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดย *T. harzianum* isolate Th-10 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคตายพรายของกล้วยเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถควบคุมการเกิดโรคตายพรายในระดับแปลงปลูกกล้วยได้

Zhang และ คณะ (2004) ศึกษา เชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 150 ไอโซเลท ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน วัสดุต่าง ๆ และดินบริเวณรอบๆ รากของข้าว ไม้ผล และพืชผักต่าง ๆ พบว่า มีเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 39 ไอโซเลทที่มีการเจริญบนอาหารทดสอบเร็วกว่าเชื้อราไอโซเลทอื่น ๆ และเชื้อราจำนวน 39 ไอโซเลท นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Sm) Sny. &Hans. สาเหตุโรคตายพรายของกล้วยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ดังนั้นจึงได้วางแผนการศึกษาทดลอง เพื่อทดสอบและประเมินประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลทต่างๆ ในการควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ซึ่งคาดว่าผลการทดลองที่ได้จะเป็นทางเลือกที่จะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรในการป้องกันกำจัดเชื้อราชนิดนี้อย่างมีประสิทธิภาพในระดับแปลงปลูก และยังเป็นการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรคพืช เพื่อสร้างระบบเกษตรกรรมของประเทศไทยให้ยืนยง และยั่งยืนสืบต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methology)

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช
การทดลองที่ 3.1.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

- อุปกรณ์

1.อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกแบคทีเรีย

2.อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้แช่แข็ง (Freezer) –20 องศาเซลเซียส

3.เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter, Shaker, Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi model 2001

4.สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

5.วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางดินเผา ปุ๋ย สารกำจัดแมลง สารป้องกันกำจัดโรคพืช และหัวพันธุ์มันฝรั่ง

- วิธีการ

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 (BS DOA-WB4) สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง

1.1 การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4

การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่าย เลี้ยงแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B.subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.1M magnesium sulfate ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ กวาดเซลล์แบคทีเรียบนผิวอาหารให้ผสมในสารละลายจากนั้นนำไปผสมกับ carboxymethylcellulose 2.5% ในน้ำ ในปริมาตรที่เท่ากัน พักไว้ 20 นาที จึงผสมกับสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผสมให้เข้ากันดีก่อนนำไปผึ่งให้แห้งในที่ร่ม บดให้เป็นผงละเอียดแล้วเก็บไว้ในถุงพลาสติกก่อนนำไปศึกษาต่อไป (Xu and Gross, 1986)

การตรวจปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่ผลิตได้ นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง จำนวน 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 3 วัน แล้วตรวจนับแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร

1.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง

2.1 การเตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum*

เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.1156 บนอาหารแข็ง PSA บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมเซลแบคทีเรียในน้ำกลั่นให้เป็นสารละลาย

แบคทีเรีย แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ $1.0x10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายแบคทีเรียไปผสมกับดินที่อบฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อดิน 8 กิโลกรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มเชื้อไว้ 2 สัปดาห์ แล้วจึงนำดินที่บ่มเชื้อไว้มาตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ประมาณ $1.0x10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร จากนั้นนำดินที่ผสมเชื้อใส่กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว จำนวน 0.8 กิโลกรัมต่อกระถาง จำนวน 120 กระถาง

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในโรงเรือนทดลอง

นำหัวพันธุ์มันฝรั่งมาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง ก่อนนำมาคลุกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก จากนั้นนำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ โดยรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร (มีความเข้มข้นของแบคทีเรีย $1x10^9$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร) ทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ไม่ได้คลุกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง และใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 7 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในดินที่ใช้ปลูกมันฝรั่งทุก 7 วัน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

การเตรียมแปลงทดลอง เตรียมแปลงทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยอบดินด้วยยูเรียผสมกับปูนขาวอัตรา 80 ต่อ 800 กิโลกรัม ต่อพื้นที่ 1 ไร่ เพื่อฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนอยู่ในดิน หลังจากอบดิน 3 สัปดาห์ จึงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ โดยปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ 1 เดือน เมื่อต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยว จึงสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในดิน จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 3.2x4 เมตร จำนวน 20 แปลง โดยใช้หัวพันธุ์จำนวน 80 หัวต่อ 1 แปลงย่อย

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 ใส่ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 5 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาวิธีการใช้ที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 ซ้ำ 4 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่หัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 2 รองก้นหลุมก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 1% โดยน้ำหนัก (10 กรัม/มันฝรั่ง 1 กิโลกรัม) และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 30 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30 วัน

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร

ทำการทดสอบในแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกร อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ขนาด 2 งาน โดยการเลือกแปลงปลูกมันฝรั่งที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ทำการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกก่อนการทดลอง

ทำการทดลอง โดยแบ่งแปลงทดลองเป็น 2 แปลง ขนาดแปลงละ 1 งาน คือ

แปลงที่ 1 ทำการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง โดยแช่หัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูกด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร หลังปลูกรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน

แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ ปลูกด้วยหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ไม่ได้แช่ด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงก่อนปลูก และใช้น้ำเปล่ารดต้นมันฝรั่งแทนการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นมันฝรั่งที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 30 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* และ แบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล นำค่าการประเมินระดับความรุนแรงของโรคที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีทางสถิติ

- **เวลาและสถานที่**

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2558 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร แปลงปลูกมันฝรั่งที่ศูนย์วิจัยการเกษตรจังหวัดเชียงใหม่ และแปลงปลูกมันฝรั่งของเกษตรกร อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

การทดลองที่ 3.1.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์*Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)
3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น
4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. วัสดุการเกษตร ได้แก่ ดิน กระถางต้นไม้ ปุ๋ย หัวพันธุ์ขิง
6. โรงเรือนปลูกพืชทดลอง

วิธีการ

1. การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo.4

การเพาะเลี้ยงและผลิตสปอร์แบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo.4

โดยการเลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 บนอาหาร Tryptic soy agar (TSA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวอายุ 18-24 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ทำการเก็บสปอร์ของแบคทีเรีย หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสปอร์ที่ได้ไปปั่นล้าง 2-3 ครั้ง เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมสูตรสำเร็จต่อไป

การเตรียมสูตรสำเร็จแบบเม็ด

นำสารประกอบต่างๆ ได้แก่ ดินขาวหรือ kaolin เกาลิน, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) และ กากน้ำตาล ในอัตราส่วนต่างๆ ผสมกับสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบ no. 4 จำนวน 1.0×10^{12} หน่วยโคโลนี ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม จนได้เป็นก้อนหมาด นำส่วนผสมที่ได้ใส่ในเครื่องปั้นเมล็ด จากนั้นนำไปอบให้แห้งในตู้อบอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

- ทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยสุ่มจากเม็ดที่ผลิตได้จำนวน 3 ครั้ง มาวัดความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 โดยนำสูตรสำเร็จแบบเม็ดที่ผสมเข้ากันดีจนเป็นก้อนหมาดๆ เล็กๆ มา drop plate บนอาหารTSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้งหมดในสูตรสำเร็จ (cfu/g)

2. ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ

นำชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในสูตรเม็ด ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน

3. **ทดสอบการประสิทธิภาพของสูตรสำเร็จชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง**

การเตรียมดินผสมแบคทีเรีย *R. solanacearum* เลี้ยงแบคทีเรีย *R. solanacearum* No.28 บนอาหารแข็ง PSA บ่มเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง เติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จำนวน 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ ผสมเซลแบคทีเรียในน้ำกลั่นให้เป็นสารละลายแบคทีเรีย แล้วนำไปวัดค่าความดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่าความดูดกลืนแสง 0.2 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แบคทีเรียมีความเข้มข้นประมาณ 1.0×10^{8} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร นำไปผสมคลุกเคล้ากับดินที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่อัตรา 1:10 (ปริมาตร:น้ำหนัก) นำดินที่ผสมแบคทีเรียไปตรวจหาปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* โดยวิธี soil dilution plates ก่อนนำดินไปบรรจุในกระถางเพื่อเตรียมไว้ปลูกพืชทดสอบต่อไป

การทดสอบการประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

นำหัวพันธุ์ขิงล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในดินที่เตรียมไว้ รดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 จำนวน 1 กรัม/น้ำ 5 ลิตร (มีความเข้มข้นของ

แบคทีเรีย 1x10^9 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร) ทุก 7 วัน สำหรับกรรมวิธีเปรียบเทียบปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อรดทุก 7 วัน

การบันทึกข้อมูล บันทึกจำนวนต้นขิงที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 7 วัน และบันทึกปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* และ *B. subtilis* ในดินที่ใช้ปลูกขิงทุก 7 วัน

4. **ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในแปลงทดลอง**

การเตรียมแปลงทดลอง เตรียมแปลงทดลองที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรจังหวัดลำปาง โดยทำการเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ ปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* No. 28 ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ประมาณ 1 เดือน ต้นมะเขือเทศแสดงอาการของโรคเหี่ยว จากนั้นสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้ย่อยสลายในแปลงทดสอบ จากนั้นเตรียมแปลงทดลองขนาด 8.0 x 1.5 เมตร จำนวน 12 แปลง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆละ 20 หัว ดังรายเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและเติมทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 2 สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและเติมทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์ขิงด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก และรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม ปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงและรดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิง ที่มีตาเริ่มงอก มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกจำนวนต้นขิงที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน
2. เก็บน้ำหนักและปริมาณของผลผลิตที่ได้

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำๆละ 20 หัว ดังรายเอียดกรรมวิธีดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและใส่สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 2 สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น รองก้นหลุมก่อนปลูกและใส่สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 3 คลุกหัวพันธุ์ขิงด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผงของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ที่อัตรา 1% โดยน้ำหนัก และรดด้วยชีวภัณฑ์ชนิดผง จำนวน 10 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 30 วัน

กรรมวิธีที่ 4 กรรมวิธีควบคุม ปลูกด้วยหัวพันธุ์ขิงและรดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

นำหัวพันธุ์ขิง ที่มีตาเริ่มงอก มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง นำไปปลูกในแปลงทดลองตามแผนการทดลอง

การบันทึกข้อมูล

1. ตรวจนับต้นที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวทุก 30 วัน
2. เก็บน้ำหนักและปริมาณของผลผลิตที่ได้

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.58 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และ แปลงปลูกขิงของเกษตรกร

การทดลองที่ 3.1.3 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dectrose agar) , PSA (Potato sucrose agar)
2. ปลาหมัก (ปุ๋ยปลาเหลว)
3.กากถั่วเหลือง
4. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subitilis* ไอโซเลท 20W1
5. สารพา (carrier) ได้แก่ ผงทัลคัม แป้งข้าวโพด ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลต์ และแป้งสาลี
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ

วิธีการปฏิบัติดังนี้:

1. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

การทดสอบสารพาต่างๆ ใช้สารพา 6 ชนิด ดังนี้

1. ใช้สารพา ทัลคัม : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
2. ใช้สารพา แป้งข้าวโพด : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
3. ใช้สารพา ปลายข้าว : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
4. ใช้สารพา รำข้าว : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
5. ใช้สารพา ซีโอไลท์ : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1
6. ใช้สารพา แป้งสาลี : ปริมาณอาหาร อัตรา 4: 1

ปฏิบัติการทดลอง ดังนี้

1. เลี้ยงแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท 20W1 ในอาหารเหลว สูตรปุ๋ยปลาหมักผสมกากถั่วเหลือง เพื่อกระตุ้นการสร้างเอ็นโดสปอร์ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน (บุษราคัม และคณะ, 2550)
2. เติมสารละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 M 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว (ข้อ1) อัตรา 10 % โดยปริมาตร
3. เติม Methyl cellulose 2.5 % อัตรา 1:1 ลงในสารละลาย (ข้อ1.2)
4. เติมสารพาหะ ตามกรรมวิธีที่ 1-5 ลงไป 4 เท่า คนให้เข้ากัน
5. นำไปผึ่งในที่ร่ม จนกระทั่งผงแป้งแห้งสนิท (ประมาณ 2 สัปดาห์)

6. บดให้ละเอียด แล้วร่อนด้วยตระแกรงร่อน จากนั้นเก็บในถุงพลาสติกใส ปิดปาก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง(25 ± 5 องศาเซลเซียส) และในสภาพในตู้เย็นช่องธรรมดา อุณภูมิ (5 ± 2 องศาเซลเซียส)

7. การบันทึกข้อมูล: ตรวจนับเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นและทุก ๆ 1 เดือน เพื่อนับเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี serial dilution plate technique บนอาหาร PSA

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง 6 ชนิด ในการควบคุมโรคใบจุดในระดับโรงเรือนทดลอง

2.1 <u>การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์</u>

นำผลิตภัณฑ์สูตรผงทั้ง 6 สูตร ไปทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคใบจุดในโรงเรือนทดลอง โดยวิธีการพ่นด้วยสารละลายผลิตภัณฑ์ โดยปฏิบัติดังนี้

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง สูตรปลายข้าว เป็นสารพา
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง สูตรรำข้าว เป็นสารพา
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง สูตรแป้งข้าวโพด เป็นสารพา
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง สูตรแป้งสาลี เป็นสารพา
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง สูตรซีโอไลท์ เป็นสารพา
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง สูตรทัลคัม เป็นสารพา
กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)
กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย cell suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* (Control +)

ปฏิบัติการทดลองดังนี้

1. ปลูกคะน้าในกระถางปลูกให้มีอายุประมาณ 30 วัน

2. นำผลิตภัณฑ์ผง *B. subtilis* สูตรต่างๆ มาผสมน้ำในอัตราต่างๆ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ช.ม.

3. นำสารละลายที่ได้ จากข้อ 2 ไปพ่นบนต้นคะน้าอายุประมาณ 30 วัน ที่เตรียมไว้ จากข้อ 1 ตามกรรมวิธีต่างๆ โดยใช้เครื่องพ่นอัดแรงดัน ให้ชุ่มสม่ำเสมอทั้งต้น

4. การพ่น: พ่นสารละลายผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง ก่อนการพ่น cell suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* 24 ช.ม. และ ทำการพ่นซ้ำอีกครั้ง หลังการพ่น cell suspension ของ *A. brassicicola* 24 ช.ม.

5.การบันทึกข้อมูล: ตรวจผลโดยให้เป็นเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบ/ต้น ที่ 15 วันหลังการทดสอบ

2.2 <u>ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง</u>

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยผลิตผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยผลิตผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยผลิตผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยผลิต mancozeb 80% WP อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย cell suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* (Control +)
กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)

ปฏิบัติการทดลองดังนี้

1. ปลูกคะน้าในกระถางปลูกให้มีอายุประมาณ 30 วัน

2. นำผลิตภัณฑ์ผง *B. subtilis* สูตรทัลคัมเป็นสารพามาผสมน้ำในอัตราต่างๆ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24 ช.ม.

3. นำสารละลายที่ได้ จากข้อ 2 ไปพ่นบนต้นคะน้าอายุประมาณ 30 วัน ที่เตรียมไว้ จากข้อ 1 ตามกรรมวิธีต่างๆ โดยใช้เครื่องพ่นอัดแรงดัน ให้ชุ่มสม่ำเสมอทั้งต้น

4. การพ่น: พ่นสารละลายผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ผง ก่อนการพ่น cell suspension ของเชื้อรา *A. brassicicola* 24 ช.ม. และ ทำการพ่นซ้ำอีกครั้ง หลังการพ่น cell suspension ของ *A. brassicicola* 24 ช.ม.

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

ตรวจผลโดยให้เป็นเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเปรียบเทียบกับพื้นที่ใบทั้งหมด โดยสุ่มต้นคะน้าจำนวน 25 ต้น/ซ้ำ ตรวจดูใบคู่ที่ 2 นับจากโคนต้น จำนวน 4 ใบต่อต้น ที่ 15 วันหลังการทดสอบ

3. ทดสอบการละลายของชีวภัณฑ์สูตรผง ในน้ำธรรมดา

- ชั่งสารชีวภัณฑ์สุตรผงที่ใช้สารพา 6 ชนิด ได้แก่ ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลท์ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และ ทัลคัม 0.5 กรัม ใส่ลงในฟาก์ เติมน้ำเปล่าลงไป 250 มล. (อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร) โดยอุณหภูมิน้ำเท่ากับ 24 ^{0} C

- คนให้ละลาย จากนั้นตรวจผลโดยสังเกตุด้วยสายตา ที่เวลา 5 10 และ 15 นาที หลังการทดสอบ ในคะแนนเป็นระดับการละลายจากละลายน้อยที่สุดจนถึงละลายดีที่สุด

เวลาและสถานที่

<u>เริ่มต้น</u>: ตุลาคม 2556 <u>สิ้นสุด</u> กันยายน 2558

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กิจกรรมย่อยที่ 3.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus spp* ในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.2.1 การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ Bacillus ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica*

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dectrose agar) , PSA (Potato sucrose agar)
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 120 ไอโซเลท
3. เชื้อรา *P. parasitica*
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ และตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ
5. พันธุ์หน้าวัว, พันธุ์กล้วยไม้ และ พันธุ์สับประรด

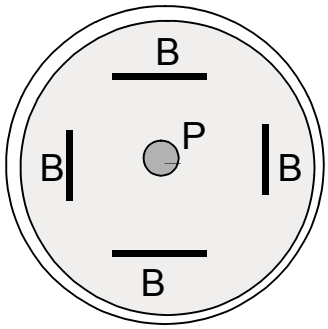
วิธีการ

ปฏิบัติการทดลอง ดังนี้

1. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว/กล้วยไม้/สับประรด ในห้องปฏิบัติการ</u>

นำแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่แยกได้และที่เก็บไว้ที่หน่วยรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร กลุ่มวิจัยโรคพืช มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคพืชที่สำคัญที่นำมาทดสอบได้แก่ โรคเน่าดำในหน้าวัว กล้วยไม้ และสับประรด โดยวิธี dual plate method โดยปฏิบัติ ดังนี้

- เลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ทดสอบบนอาหาร PDA และเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. แต่ละไอโซเลทลงบนอาหาร PSA จนกระทั่งเส้นใยหรือโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ
- ใช้ cock borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อราทดสอบบริเวณขอบโคโลนี วางลงบนกึ่งกลางของจานเลี้ยงเชื้อ
- ใช้ Loop ขนาดมาตรฐานแตะเบาๆที่ *Bacillus sp.* ทดสอบ ที่เลี้ยงไว้ นำมาขีดเป็นเส้นตรง ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ขนานกับโคโลนีของเชื้อราทดสอบ 4 ด้านระยะห่างจากโคโลนีเชื้อราประมาณ 1 เซนติเมตร (รูปที่ 1)
-ตรวจผลโดยวัดขนาดความกว้างของ Inhibition zone และ ขนาดของโคโลนีของเส้นใยของเชื้อราทดสอบที่ถูกยับยั้ง



ภาพที่ 1 แสดงการทดสอบโดยวิธี dual plate technique , P คือโคโลนีเชื้อราทดสอบ, B คือ *Bacillus* sp. ทดสอบ

2. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำหน้าวัว/กล้วยไม้/สับประรด ในสภาพเรือนทดลอง</u>

โดยวิธี detached leaf

<u>- การวางแผนการทดลอง</u>

2.1 <u>ปี 2554</u> ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย Bacillus ไอโซเลท GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 ในการควบคุมโรคเน่าดำในหน้าวัว

วางแผนแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่1 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท GM011
กรรมวิธีที่2 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 17G5
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 20W14
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 19W13
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 22W11
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 17G15
กรรมวิธีที่ 7 C- (วางชิ้นอาหารวุ้น PSA บนใบหน้าวัว ที่พ่นด้วย Bacillus)
กรรมวิธีที่ 8 C+ (วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *P. parasitica* บนใบพืชที่ไม่มีการพ่น Bacillus)

2.2 ปี 2555 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย Bacillus ไอโซเลท 2G24 19W13 8W14 KA2 2G23 และ 3G14 ในการควบคุมโรคเน่าดำในกล้วยไม้

วางแผนแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 2G24

กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 19W13

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 8W14

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท KA2

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 2G23

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 3G14

กรรมวิธีที่ 7 C- (วางชิ้นอาหารวุ้น PSA บนใบกล้วยไม้ ที่พ่นด้วย Bacillus)

กรรมวิธีที่ 8 C+ (วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *P. parasitica* บนใบพืชที่ไม่มีการพ่น Bacillus)

2.3 ปี 2556 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย Bacillus ไอโซเลทในการควบคุมเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำสับประรด

วางแผนแบบ RCB มี 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่1 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 1G8

กรรมวิธีที่2 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 2G23

กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 20W22

กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท 20W32

กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย Cell suspension ของ Bacillus ไอโซเลท BK5

กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วย metalaxyl 25% WP อัตรา 30 กรัม/ต่อ น้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 C- (วางชิ้นอาหารวุ้น PSA บนใบสับประรด ที่พ่นด้วย Bacillus)

กรรมวิธีที่ 8 C+ (วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *P. parasitica* บนใบพืชที่ไม่มีการพ่น Bacillus)

- การดำเนินการ

1. การเตรียมเชื้อรา

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหาร PDA ให้มีอายุ 5 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราจะเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2 ใช้ cock borrer ขนาดประมาณ 0.5 ซ.ม เจาะเส้นใยเชื้อบนอาหารวุ้น เพื่อเตรียมไว้วางบนใบพืชทดสอบ

2. การเตรียมแบคทีเรีย Bacillus

2.1 เลี้ยงแบคทีเรีย bacillus ที่จะทดสอบ บนอาหาร PSA ให้มีอายุ 48 ช.ม.

2.2 ทำเป็น cell suspension โดยใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ประมาณ 30 ซี.ซี ต่อจานอาหาร ขุดเอาส่วนของเซลล์แบคทีเรียที่เจริญบริเวณผิวหน้าอาหาร

2.3 คนให้เข้ากัน ปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ม.ล.

3. การทดสอบ

3.1 พ่น cell suspension ของ bacillus ทั้ง 6 ไอโซเลท ลงต้นพืชทดสอบให้ชุ่มทั้งใบและต้น ทิ้งไว้ 24 ช.ม.

3.2 นำชิ้นวุ้นเส้นใยที่เจาะเตรียมไว้ (ข้อ 1.2) วางบนใบพืชทดสอบ ที่ทำแผลไว้ โดยคว่ำส่วนของเส้นใยลง 4 ใบต่อต้น 30 ต้นต่อไอโซเลท (ภาพที่ 1และ2)

3.3 มีกรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี คือ C+ (วางชิ้นวุ้นเชื้อรา *P. parasitica* บนใบพืชที่ไม่มีการพ่น Bacillus) และ C- (วางชิ้นอาหารวุ้น PSA บนใบหน้าวัว/กล้วยไม้ ที่พ่นด้วย Bacillus)

3.4 ตรวจผลโดยวัดพื้นที่ของแผลพืชทดสอบ เปรียบเทียบกับชุด control ที่ 3 และ/หรือ 5, 7 วัน หรือเมื่ออาการของโรคปรากฏชัดเจน

เวลาและสถานที่

เวลา **เริ่มต้น** ปี พ.ศ. 2554 สิ้นสุดปี พ.ศ. 2556

สถานที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

(ก) (ข)

ภาพที่ 2 แสดงการปลูกเชื้อบนใบหน้าวัวโดยวิธี detached leaf

(ก) การวางเชื้อ *Phytophthora parasitica*

(ข) ลักษณะอาการที่ปรากฏ หลังปลูกเชื้อ 3 วัน

ภาพที่ 3 แสดงการปลูกเชื้อบนใบกล้วยไม้โดยวิธี detached leaf

(ก) การทำแผลบนกล้วยไม้ก่อนปลูกเชื้อ

(ข) การวางเชื้อ *Phytophthora parasitica*

(ค) ลักษณะอาการที่ปรากฏ หลังปลูกเชื้อ 3 วัน

ภาพที่ 4 แสดงการปลูกเชื้อบนใบสับประรดโดยวิธี detached leaf

(ก) การทำแผลบนในสับประรดก่อนปลูกเชื้อ

(ข) การวางเชื้อ *Phytophthora parasitica*

(ง) ลักษณะอาการที่ปรากฏ หลังปลูกเชื้อ 7 วัน

การทดลองที่ 3.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Erwinia carotovora subsp. carotovora และ E. chrysanthemi สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

- อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ Wakimoto's semisynthetic potato medium (PSA) และ Nutrient glucose agar (NGA)

2. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections จำนวน 58 ไอโซเลท และแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ จำนวน 12 ไอโซเลท

3. เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *E. carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech) จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections อย่างละ 5 ไอโซเลท และที่แยกเชื้อแบคทีเรีย จากสวนกล้วยไม้สกุลหวาย Ecc จำนวน 6 ไอโซเลท และ Ech จำนวน 10 ไอโซเลท

4. ต้นกล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) อายุ 12 เดือน

5. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ, ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง, หม้อนึ่งความดัน, ตู้ควบคุมอุณหภูมิ, ตู้อบ (oven) และอุปกรณ์เครื่องแก้ว เป็นต้น

6. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- วิธีการ

1. การรวบรวม และแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช โดยคัดเลือกไอโซเลทที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช (ณัฏฐิมา และคณะ, 2551) นำมาแยกเก็บเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ โดยเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดบนอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

1.2 แยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากบริเวณผิวใบ ผิวราก และที่เจริญในลำต้นหรือใบกล้วยไม้สกุลหวาย โดยเลือกตัวอย่างต้นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตดี แข็งแรง และปลอดโรค ด้วยวิธี tissue transplanting method โดยตัดส่วนของบริเวณที่จะแยกเชื้อ (ราก หรือใบ) ออกเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แช่ในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืช วางบนอาหารสังเคราะห์ PSA สำหรับการแยกเชื้อที่เจริญในลำต้นและใบ ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ซับให้แห้งด้วยกระดาษ นำมาสับหรือบดในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ แช่ทิ้งไว้ เป็นเวลา 3-5 นาที ใช้ลูปที่ลนไฟฆ่าเชื้อ จุ่มในน้ำบดตัวอย่างมาลาก (streak) บนอาหารสังเคราะห์ PSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเลือกโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ และเป็นแกรมบวก นำไปเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PSA ให้รหัส และเก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การรวมรวม และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

2.1 นำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่แยกและเก็บเชื้อได้ในกล้วยไม้ จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช จำนวน 58 ไอโซเลท เก็บเชื้อในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บในหลอดบนอาหารเอียง (NGA slant) เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2 แยกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech บนกล้วยไม้สกุลหวายจากสวนของเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม โดยเลือกใบและลำต้นต้นที่เป็นโรค (รูปที่ 1 และ 2) ตัดชิ้นส่วนพืชบริเวณแผลเชื่อมต่อกับส่วนที่ไม่เป็นโรค ขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 1 - 2 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืชวางบนหยดน้ำ 50 ไมโครลิตร ตัดหรือบดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วใช้ลูปแตะตรงบริเวณแผลที่แสดงอาการเน่าเละนำมา streak บนอาหารสังเคราะห์ NGA หลังจากนั้นบ่มที่เชื้ออุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหาร NGA ให้บริสุทธิ์ ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) จากนั้นเก็บรักษาแบคทีเรียบริสุทธิ์บนอาหาร NGA slant เททับด้วยพาราฟินเหลว เพื่อการศึกษาต่อไป

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ Ecc และ Ech ที่รวบรวมได้ เลี้ยงบนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง นำมาเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อ (cell suspension) โดยให้มีค่า optical density (O.D.) เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเซลล์ ประมาณ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร; cfu/ml) ที่ความเข้มแสง 600 นาโนเมตร จากนั้นใช้หลอดฉีดยาแบบพลาสติกขนาดเล็ก (1 - 2 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อดูด cell suspension ของเชื้อ Ecc และ Ech ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ ไล่ฟองอากาศออกแล้วฉีด cell suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเข้าสู่เนื้อใบด้านบนของกล้วยไม้สกุลหวาย อายุ 12 เดือน อย่างช้า ๆ เก็บต้นกล้วยไม้ที่ปลูกเชื้อ ในถุงพลาสติกพ่นน้ำให้ความชื้น โดยระวังไม่ให้น้ำหรือถุงพลาสติกโดนแผลที่ทำการปลูกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech (รูปที่ 3) บันทึกลักษณะอาการ ระยะเวลาการเกิดโรค การพัฒนาอาการ และประเมินความรุนแรงของโรคที่ปรากฏหลังปลูกเชื้อเป็นระยะ 24 และ 48 ชั่วโมง ดัดแปลงตามวิธีของ ศศิธร (2547) โดยวัดระดับความรุนแรงของโรค 0 ถึง 4 โดยที่ 0 คือไม่ปรากฏอาการของโรค และระดับ 1, 2, 3 และ 4 หมายถึงแสดงอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้รุนแรงเท่ากับ 1-25, 26-50, 51-75 และ 76-100 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ใบทั้งหมดของกล้วยไม้ตามลำดับ เมื่อกล้วยไม้แสดงอาการเป็นโรค ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค (reisolation) ด้วยวิธี cross streak บนอาหาร NGA โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยว และนำมาปลูกเชื้อลงบนกล้วยไม้ต้นใหม่ (reinoculation) อีกครั้งตามกฎการพิสูจน์โรคของ Koch (Koch's postulation) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มา streak บนอาหาร NGA ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* 1 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ

4.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections จำนวน 58 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากบริเวณผิวใบ ในสวนของเกษตรกรที่จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 12 ไอโซเลท รวม 70 ไอโซเลท นำมาเลี้ยงบนอาหารเหลว Nutrient Glucose Broth (NGB) บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 (ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^8 cfu/ml)

4.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุดลำดับที่ 1 อย่างละ 1 ไอโซเลท เป็นตัวแทนในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เพื่อเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูง เลี้ยงบน

อาหารเหลว NGB เขย่า 150 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2 จากนั้นใช้วิธี double layer culture โดยชั้นล่างเทอาหาร NGA รองพื้นไว้บางๆ ปริมาณ 15 มิลลิลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง (ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง) ใช้ micropipette ดูด cell suspension เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค Ecc และ Ech ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (มล.) ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ที่หลอมอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มล. ผสมให้เข้ากันกัน แล้วเททับลงในจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มล. ต่อหนึ่งจานเลี้ยงเชื้อ ให้ส่วนบนกระจายคลุมทั่วผิวหน้าชั้นล่างที่เทไว้แล้วข้างต้น ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยวิธี disc diffusion method โดยใช้ micropipette ดูด cell suspension เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ (ข้อ 4.1) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มล. ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ปากคีบที่ลนไฟฆ่าเชื้อคีบกระดาษกรองลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ที่ผสมเชื้อสาเหตุโรคที่เตรียมไว้ข้างต้น 4 จุดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ส่วนตรงกลางวางกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน (รูปที่ 4)

การบันทึกผล ตรวจผลหลังการทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการวัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* 5 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ

5.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผ่านการคัดเลือกเบื้องต้น เลี้ยงบนอาหารเหลว NGB บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2

5.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงและรวดเร็ว ลำดับที่ 2 - 6 ระดับ อย่างละ 5 ไอโซเลท มาใช้ในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เนื่องจากในสภาพสวนกล้วยไม้ของเกษตรกรล้วนมีเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละมากกว่าหนึ่งไอโซเลท ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้มากกว่าหนึ่งไอโซเลท โดยนำเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech เลี้ยงบนอาหารเหลว NGB เขย่า 150 รอบต่อนาที บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าความขุ่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 0.2

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เทคนิคการเตรียมด้วยวิธี double layer culture และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Ecc และ Ech ด้วยวิธี disc diffusion method เช่นเดียวกับ (ข้อ 4.3)

การบันทึกผล ตรวจผลโดยวัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส หลังการทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

6. ทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรค และวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลที่มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรง และรวดเร็วที่สุดอย่างละ 1 ไอโซเลท มาบนอาหาร NGB บนเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^4, 10^6 และ 10^8 cfu/ml นำไปทดสอบวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum (300 - 600 mesh) ลงไปในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial suspension) เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผลบนใบกล้วยไม้ก่อนการ spray ด้วย bacterial suspension

การทดสอบอัตราความเข้มข้น และวิธีการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 14 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray

กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject

กรรมวิธีที่ 3 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี spray

กรรมวิธีที่ 4 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี inject

กรรมวิธีที่ 5 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี spray

กรรมวิธีที่ 6 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ecc ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/mlปลูกเชื้อด้วยวิธี inject

กรรมวิธีที่ 7 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray

กรรมวิธีที่ 8 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^4 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject

กรรมวิธีที่ 9 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray

กรรมวิธีที่ 10 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^6 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject

กรรมวิธีที่ 11 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray

กรรมวิธีที่ 12 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย Ech ที่อัตราความเข้มข้น 10^8 cfu/ml ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject

กรรมวิธีที่ 13 น้ำเปล่า ปลูกเชื้อด้วยวิธี spray (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

กรรมวิธีที่ 14 น้ำเปล่า ปลูกเชื้อด้วยวิธี inject (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ที่มีอัตราความเข้มข้น 10^4, 10^6 และ 10^8 cfu/ml มาทดสอบหาอัตราความเข้มข้น และวิธีการปลูกเชื้อที่เหมาะสม ด้วยวิธีการพ่น (spray) และการฉีด (inject) โดยทดสอบบนใบของกล้วยไม้สกุลหวาย

การบันทึกข้อผล check การเกิดโรคทุกๆ 7 วัน โดยวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

7. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน

คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคทั้ง 2 ชนิด มาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมโรคในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง ซึ่งจำลองให้มีสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับสภาพแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกร โดยทดสอบในกล้วยไม้สกุลหวาย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ อย่างน้อย 5 ไอโซเลท เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^9 cfu/ml โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ โดยนำแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 ตามผลที่ทดสอบได้

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์กับพืชทดสอบ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB ประกอบด้วย 7 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2
กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท Bk5
กรรมวิธีที่ 3 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK9
กรรมวิธีที่ 4 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK12
กรรมวิธีที่ 5 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 17W18
กรรมวิธีที่ 6 พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)
กรรมวิธีที่ 7 น้ำเปล่า (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ข้างต้น ฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณใบของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเครื่องพ่นมือ ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงทำการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยวิธีการปลูกเชื้อตามผลการทดสอบที่ได้ ทดสอบบนใบของกล้วยไม้สกุลหวาย (รูปที่ 5)

การบันทึกผล check การเกิดโรคทุกๆ 7 วัน โดยวัดขนาดของแผลบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

8. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพสวน

8.1 การสำรวจสวนที่มีปัญหาโรคเน่าเละกล้วยไม้และการเตรียมแปลง โดยออกสำรวจ และสอบถามเกษตรกรถึงปัญหาของโรคเน่าเละ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech เมื่อได้แปลงที่พบการระบาดของโรค จึงทำการติดต่อเจ้าของสวนเพื่อขอเช่าเหมาแปลง เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพและวิธีการควบคุมโรคเน่าเละของกล้วยไม้ในสภาพสวน โดยในงานทดลองใช้กล้วยไม้สกุลหวาย ที่มีอายุ 1 ปี จำนวน 864 ต้น แล้วนำต้นกล้วยไม้สกุลหวาย มาจัดเรียงตามแผนการทดสอบที่จัดเตรียมไว้ ซึ่งมีขนาดแปลง 1 x 15 เมตร (รูปที่ 14) จากนั้นดูแลรดน้ำและบำรุงต้นกล้วยไม้ตามปกติ เพื่อให้กล้วยไม้ได้ตั้งตัวประมาณ 2 เดือน ก่อนที่จะมีการทดสอบต่อไป

8.2 แยกเก็บเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จากแปลงที่ทดสอบหลังจากที่สำรวจแปลง และได้แปลงที่ใช้สำหรับการทดสอบแล้ว ทำการเก็บตัวอย่างโรคเน่าเละ มาแยกเชื้อว่าในแปลงเป็นเชื้อแบคทีเรีย Ecc หรือ Ech จากนั้นจึงเก็บเชื้อเพื่อใช้สำหรับการทดสอบต่อไป

8.3 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc หรือ Ech สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพสวน โดยเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือก นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^9 cfu/ml โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละของกล้วยไม้ โดยนำเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) ซึ่งแยกได้จากแปลงที่ทำการทดสอบ เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้น 10^8 ตามผลที่ทดสอบได้ (ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech ไม่พบในแปลงที่ทดสอบ)

แบ่งการทดสอบเป็น 2 การทดลอง คือ

1. ทำแผลก่อนปลูกเชื้อ Ecc สาเหตุโรคเน่าเละซึ่งแยกได้จากแปลงที่ทำการทดสอบโดยแบบไม่ต้องทำแผลบนใบกล้วยไม้

2. ไม่ทำแผลก่อนปลูกเชื้อแบคทีเรีย Ecc โดยวางแผนการทดสอบแบบ RCB ประกอบด้วย 8 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2 ที่อัตราความเข้มข้น 10^9 cfu/ml

กรรมวิธีที่ 2 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK5 ที่อัตราความเข้มข้น 10^9 cfu/ml

กรรมวิธีที่ 3 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK9 ที่อัตราความเข้มข้น 10^9 cfu/ml

กรรมวิธีที่ 4 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK12 ที่อัตราความเข้มข้น 10^9 cfu/ml

กรรมวิธีที่ 5 เซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 17W18 ที่อัตราความเข้มข้น 10^9 cfu/ml

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)

กรรมวิธีที่ 7 น้ำเปล่า ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

กรรมวิธีที่ 8 น้ำเปล่า ไม่ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

ใช้เข็มเขี่ยปลายแหลมทำแผลบนใบกล้วยไม้เฉพาะกรณีทำแผลก่อนปลูกเชื้อ จากนั้นก่อนนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 ที่เตรียมไว้ข้างต้นฉีดพ่นให้ทั่วบริเวณใบของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเครื่องพ่นมือ ทิ้งไว้ให้แห้ง จึงทำการปลูกเชื้อแบคทีเรีย Ecc สาเหตุโรคเน่าเละที่ผสมด้วยผง carborundum (300 - 600 mesh) ในสารแขวนลอย จากนั้นดูแลรดน้ำ และบำรุงต้นกล้วยไม้ตามปกติ (รูปที่ 15)

การบันทึกข้อผล check การเกิดโรคหลังการทดสอบ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยประเมินอาการเน่าเละบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย

- เวลาและสถานที่ : **ระยะเวลา** 4 ปี **เริ่ม** ตุลาคม 2553 **สิ้นสุด** กันยายน 2557
สถานที่ : ห้องปฏิบัติการ และโรงเรือนทดลอง กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และสวนกล้วยไม้ ณ อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร

การทดลองที่ 3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *Rhizoctonia solani*

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปากกาเคมี หนังยาง

2. สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)

4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระบอกตวง ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม สไลด์ cover slip

5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง

6. กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ*R. solani* โดยชีววิธี ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อรา R. solani และการแยกเชื้อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา R. solani จากแหล่งปลูกในไร่เกษตรกร นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method จากส่วนของขอบแผลจากพืชที่เป็นโรค โดยตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ทุกขั้นตอนปฏิบัติงานโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

1.2. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R*ใ *solan*. ในห้องปฏิบัติการ

นำจุลินทรีย์ที่เก็บไว้หน่วยเก็บจุลินทรีย์โรคพืช มาทดทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบททีเรียทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร RNV อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยขีดเชื้อจุลินทรีย์มีความยาว 1 ซม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว

2. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ในสภาพเรือนทดลอง

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ในสภาพเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยของเชื้อรา *R. solani* มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

2.1 การปลูกพืชทดสอบ

ปลูกพืชทดสอบ ในกระถางพลาสติกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 50 ซ.ม. จำนวน 4 ต้นต่อกระถาง 4 กระถางต่อ 1 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 ซ้ำ

2.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อรา *R. solani* เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

นำเมล็ดข้าวฟ่าง มาแช่น้ำนานประมาณ 18 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำที่แช่เมล็ด 3-4 ครั้ง เพื่อให้เมล็ดสะอาด จากนั้นจึงนำเมล็ดบรรจุลงในถุงพลาสติกทนความร้อน ปริมาณ 2 ใน 3 ของภาชนะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งในวันถัดมา เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ลงไปในถุงข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเริ่มมีการเจริญของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง เขย่าถุงเพื่อให้เชื้อกระจาย ไม่เกาะเป็นก้อนแข็ง บ่มไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญอยู่มาบุบให้แตกเพื่อให้มีขนาดเล็กลงและมีความสม่ำเสมอ นำเชื้อที่เตรียมได้ไปปลูกเชื้อให้กับพืชที่ปลูกในเรือนทดลอง

2.3 การพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ตามชนิดที่ได้จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ

ปลูกข้าวโพดทดสอบ ปลูกเชื้อและพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ตามกรรมวิธี ทุก 7 วัน จำนวน 4 ครั้ง ประเมินความรุนแรงโรคก่อนพ่นสารทุกครั้ง และหลังพ่นสารครั้งสุดท้าย 7 วัน

3 การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา*R. solani* ในแปลงทดลอง

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองมาแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัด เชื้อรา *R. solani* มาทดสอบผลในการควบคุมโรคและประเมินความเสียหายต่อผลผลิตในสภาพแปลงทดลอง

3.1 การปลูกพืชทดสอบ

ปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอในแปลงโดยมีระยะปลูก 0.75x0.5 เมตร จำนวน 2 ต้น/หลุม ขนาดแปลงย่อย 3.0x6.5 เมตร จำนวน 4 แถว โดยใช้ระยะห่างระหว่างแถวเท่ากับ 75 เซ็นติเมตร ระยะระหว่างต้น 25 เซ็นติเมตร จำนวน 1 ต้นต่อหลุม ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ ก่อนปลูก และใส่ปุ๋ยยูเรีย อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวโพดอายุได้ 25 วันหลังปลูก

-3.2- การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PSB (Physic Soil Bloth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำไปผสมน้ำกลั่นโดยใช้อัตราส่วน 1:2 พ่นบนต้นข้าวโพดทดสอบ

-3.3 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

เมื่อข้าวโพดอายุ 14 วัน พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ทุก 7 วัน จำนวน 6 ครั้ง การประเมินความรุนแรงของโรค สังเกตอาการ บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคเฉพาะ 2 แถวกลาง จำนวน 20 ต้น/ซ้ำ ก่อนที่จะมีการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ครั้งที่ -3

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ มีกรรมวิธีฉีดพ่นน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 1
กรรมวิธีที่ 2 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 2
กรรมวิธีที่ 3 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 3
กรรมวิธีที่ 4 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 4
กรรมวิธีที่ 5 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 5

กรรมวิธีที่ 6 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 6
กรรมวิธีที่ 7 พ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 7
กรรมวิธีที่ 8 พ่นน้ำเปล่า

4. การประเมินความรุนแรงของโรค

สังเกตอาการลักษณะอาการของโรคกาบและใบไหม้ก่อนพ่นสารทดลองทุกครั้ง

บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคเฉพาะ 2 แถวกลาง จำนวน 20 ต้น/ซ้ำ ก่อนที่จะมีการพ่นสารป้องกันกำจัดโรคพืชทุกครั้ง ให้เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคโดยประเมินพื้นที่การเกิดโรคทั้งต้น

5. เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติที่เหมาะสม รายงานผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2556
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงปลูกพืชของเกษตรกร

การทดลองที่ 3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides*

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรีย ได้แก่ PDA (Potato dectrose agar) , PSA (Potato sucrose agar)
2. แบคทีเรีย *Bacillus* spp. 6 ไอโซเลท ได้แก่ 20W16 20W8 1G8 20W33 20W5 และ B23
3. สารทัลคัม
4. ต้นกล้าพริก (พริกมัน)
5. แปลงทดสอบ
6. ปุ๋ยเคมี
7. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดสอบ ตู้เขี่ยเชื้อ ฯลฯ

วิธีการ

เวลาและสถานที่

<u>เริ่มต้น</u>: 1 ตุลาคม พ.ศ. 2556 <u>สิ้นสุด</u> 30 กันยายน พ.ศ. 2558

<u>สถานที่ดำเนินการทดลอง</u>: ที่ อ.ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี และกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

<u>การดำเนินการ</u>

1. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธีพ่นด้วย Cell suspension

1.1 การเตรียม Cell suspensionของ *Bacillus* spp. :

- เลี้ยง *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ได้แก่ 20W16 20W8 1G8 20W33 และ 20W5 ซึ่งผ่านการคัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ (บุษราคัมและคณะ, 2549) บนอาหาร PSA เป็นเวลา 2 วัน
- นำมาทำเป็น cell suspensionโดยใส่น้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 20 มล.ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ ขูดเอาเซลแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารออก ซึ่งจะได้ cell suspension ที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 โคโลนี/มล.

1.2 การเตรียมเชื้อรา C. *gloeosporioides*

- เลี้ยงเชื้อรา C. *gloeosporioides* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกระทั่งเชื้อราขึ้นเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

- นำมาทำเป็น cell suspension โดยใช้น้ำนึ่งฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับ *Bacillus* spp. ปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ 10^4 โคโลนี/มล.

1.3 การเตรียมพืชและแปลงทดลอง

- เตรียมแปลงขนาดกว้าง 1.5 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะห่างระหว่างแปลงประมาณ 80 เซนติเมตร

- ปลูกพริกที่จะทดสอบโดยวิธีการย้ายปลูกต้นกล้าที่มีอายุ 1 เดือน โดยปลูกให้มีระยะระหว่างแถวประมาณ 50 ซ.ม. ระหว่างต้น 50 ซ.ม. ปลูก 2 แถวคู่ จนกระทั่งพริกมีอายุประมาณ 2 เดือน หรือระยะเริ่มติดผล จึงเริ่มดำเนินการทดลอง

1.4 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วย cell suspension *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W16
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วย cell suspension *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W8
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วย cell suspension *Bacillus* spp. ไอโซเลท 1G8
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วย cell suspension *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W33
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วย cell suspension *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W5
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสาร แมนโคเซบ 80% WP
กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)
กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วย C. *gloeosporioides* (Control +)

1.5 การดำเนินการทดลอง : โดยวิธีพ่นด้วยเครื่องพ่นชนิดอัดลม โดยพ่น *Bacillus* spp. ก่อนพ่น *C. gloeosporioides* 2 วัน และพ่นอีกครั้งหลังจากพ่น *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 2 วัน

1.6 การบันทึกข้อมูล: ตรวจผลโดยนับจำนวนผลพริกที่เป็นโรค เปรียบเทียบกับจำนวนผลพริกทั้งหมด นำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคหลังการทดสอบ 7 วัน โดยแบ่งเก็บผลพริกเป็น 2 รุ่น หลังจากเก็บผลพริกรุ่นที่ 1 แล้ว กรรมวิธีที่ 1-5 ทำการพ่น cell suspension *Bacillus* ทั้ง 5 ไอโซเลท เพื่อป้องกัน อีกครั้ง หลังจากนั้น เมื่อผลพริก รุ่นที่ 2 แก่ จึงทำการเก็บรวบรวมผลพริกทั้งหมด นำมาตรวจผลการเกิดโรคอีกครั้ง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธีพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์สูตรผง

การทดลองนี้ได้ทำการเพิ่ม *Bacillus* spp. ไอโซเลท B23 ซึ่งผ่านการทดสอบในห้องปฏิบัติการในการยับยั้งเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก (ธารทิพยและคณะ, 2557)

2.1 วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 12 กรรมวิธี ประกอบด้วย

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W16 อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W33 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W33 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท 20W33 อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท B23 อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 8 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท B23 อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 9 พ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs ไอโซเลท B23 อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 10 พ่นด้วยสาร คาร์เบนดาซิม 50% WP อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 11 พ่นด้วย C. *gloeosporioides* (Control +)
กรรมวิธีที่ 12 พ่นด้วยน้ำเปล่า (Control -)

2.2 การดำเนินการทดลอง : โดยวิธีพ่นด้วยเครื่องพ่นชนิดอัดลม โดยพ่น *Bacillus* spp. ก่อนพ่น *C. gloeosporioides* 2 วัน และพ่นอีกครั้งหลังจากพ่น *C. gloeosporioides* เป็นเวลา 2 วัน

2.3 การบันทึกข้อมูล: ตรวจผลโดยนับจำนวนผลพริกที่เป็นโรค เปรียบเทียบกับจำนวนผลพริกทั้งหมด นำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคหลังการทดสอบ 7 วัน โดยแบ่งเก็บผลพริกเป็น 2 รุ่น หลังจากเก็บผลพริกรุ่นที่ 1 แล้ว กรรมวิธีที่ 1-5 ทำการพ่น cell suspension *Bacillus* ทั้ง 5 ไอโซเลท เพื่อป้องกัน อีกครั้ง หลังจากนั้น เมื่อผลพริก รุ่นที่ 2 แก่ จึงทำการเก็บรวบรวมผลพริกทั้งหมด นำมาตรวจผลการเกิดโรคอีกครั้ง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธีการแช่ผลพริก

3.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี
กรรมวิธีที่ 1 แช่ผลพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ต่อผลพริก 1 กก.
กรรมวิธีที่ 2 แช่ผลพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 30 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ต่อผลพริก 1 กก.
กรรมวิธีที่ 3 แช่ผลพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ต่อผลพริก 1 กก.
กรรมวิธีที่ 4 แช่ผลพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 10 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ต่อผลพริก 1 กก.
กรรมวิธีที่ 5 แช่ผลพริกด้วยน้ำเปล่า และปลูกเชื้อ Cg (C+)
กรรมวิธีที่ 6 ผลพริกสด ไม่มีการปลูกเชื้อ Cg (C-)

3.2 การดำเนินการทดลอง:

3.2.1 เลือกผลพริกที่มีความแก่สม่ำเสมอ และยังมีสภาพเขียวมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า

3.2.2 ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการพ่นด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ผึ่งไว้ให้แห้ง

3.2.3 นำผลพริกที่ได้มาแช่ด้วยสารละลายชีวภัณฑ์ Bs เป็นเวลา 30 นาที

3.2.4 นำผลพริกจากข้อ 3. มาผึ่งให้แห้ง บ่มไว้ 24 ชั่วโมง

3.2.5 จากนั้นนำผลพริกที่ได้จากข้อ 4 มาล้างผงแป้งออกอีกครั้งด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ผึ่งให้แห้ง

3.2.6 นำผลพริก(กรรมวิธีที่ 1-5) มาปลูกเชื้อโดยการวางด้วยเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร PDA ซึ่งเจาะด้วย cock borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. นำมาวางลงบนผลพริกซึ่งทำแผลไว้ โดยให้ส่วนของเส้นใยเชื้อราสัมผัสกับผิวผลพริก ทิ้งไว้ 24 ชม.จึงนำชิ้นส่วนของอาหารวุ้นออก

มีกรรมวิธีเปรียบเทียบเป็น positive control (C^+) และ negative control (C^-) ปฏิบัติดังนี้

-การเตรียมC^+ ปฏิบัติเช่นเดียวกับ1-5 แต่แช่ผลพริกด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อแทน cell suspension ของ *Bacillus* sp. แล้วจึงวางด้วยเชื้อ *C. gloeosporioides*

-การเตรียม C^- ปฏิบัติเช่นเดียวกับ 1-5 แต่วางด้วยชิ้นวุ้น PDA ที่ไม่มีเชื้อรา

3.3 การบันทึกข้อมูล: ตรวจผลโดยวัดขนาดของแผลบนผลพริกเปรียบเทียบกับชุด control ที่เวลา 5 วันหลังทดสอบ

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ติดมากับเมล็ดพริก โดยวิธีคลุกเมล็ด

4.1 การเตรียมเมล็ดพริกติดเชื้อ:

-นำผลพริกที่แก่เต็มที่มาทำการปลูกเชื้อ *C. gloeosporioides* โดยใช้เข็มเขี่ยเขี่ยเชื้อรา วางลงบนผลพริก 4 จุด จากนั้นนำไปบ่มเชื้อในกล่องพลาสติกที่บุด้วยกระดาษฟางเพื่อให้ความชื้น

-ปล่อยให้ผลพริกเป็นโรคทั้งผล แล้วทิ้งจนผลแห้งจึงทำการเก็บเมล็ดพริกมาผึ่งลมจนแห้ง

- สุ่มเมล็ดพริกมาวางบนอาหาร PDA เพื่อตรวจเช็คเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ ก่อนนำมาใช้ทดสอบ

4.2 นำเมล็ดพริกติดเชื้อที่ได้ มาทดสอบโดยวิธีการคลุกเมล็ดด้วยผลิตภัณฑ์ผง *Bacillus* spp. อัตราต่างๆ เปรียบเทียบกับสารป้องกันกำจัดโรคพืชคาร์บอกซิน 75 % WP

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คลุกเมล็ดพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 50 กรัมต่อเมล็ดพริก 1 กก.

กรรมวิธีที่ 2 คลุกเมล็ดพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 40 กรัมต่อเมล็ดพริก 1 กก.

กรรมวิธีที่ 3 คลุกเมล็ดพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 30 กรัมต่อเมล็ดพริก 1 กก.

กรรมวิธีที่ 4 คลุกเมล็ดพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 20 กรัมต่อเมล็ดพริก 1 กก.

กรรมวิธีที่ 5 คลุกเมล็ดพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 10 กรัมต่อเมล็ดพริก 1 กก.

กรรมวิธีที่ 6 คลุกด้วยสารคาร์บอกซิน 75 % WP อัตรา 3 กรัมต่อเมล็ดพริก 1 กก.

กรรมวิธีที่ 7 ไม่มีการคลุกเมล็ด (Control -)

4.3 การบันทึกผล: ตรวจผลโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมล็ดพริกที่พบเชื้อรา *C. gloeosporioides* บนอาหาร PDA ที่ 3 วัน เปรียบเทียบกับกรรมวิธีคลุกด้วยสารคาร์บอกซิน 75% WP และ กรรมวิธีไม่คลุกผลิตภัณฑ์ผง Bacillus spp. หลังการทดสอบ5 วัน

การทดลองที่ 3.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd.) E.J. Butler & Bisby สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างโรคพืช
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเชื้อรา
3. อาหารเลี้ยงเชื้อรา อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย
4. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ตู้เขี่ยเชื้อ
5. แบคทีเรียบาซิลลัส ซับทิลิส (*Bacillus subtilis*)
6. เรือนทดลองปลูกพืช
7. เมล็ดพันธุ์หรือต้นกล้าพริก
8. ป้าย ปากกาเขียนป้าย

- วิธีการ

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องปฏิบัติการ (2557)

<u>การเตรียมเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ</u>

เก็บผลพริกที่แสดงอาการโรคแอนแทรคโนส แยกเชื้อรา *C. capsici* จากผลพริก นำไปทำสปอร์เดี่ยว (single spore) จากนั้นตัดย้ายเส้นใยที่เจริญจากสปอร์ ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ให้ได้เชื้อ *C. capsici* บริสุทธิ์ เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่เก็บรักษาไว้ในหน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตรมาเลี้ยงบนอาหาร PSA จนโคโลนีเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อ

<u>การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสโดยวิธี dual culture technique</u>

ทดสอบเชื้อรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของ พริกโดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9 เซ็นติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสจากโคโลนี อายุ 14 วันวางลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ โดยวางห่างจากขอบจาน 2.5 เซ็นติเมตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียใช้ loop แตะเชื้อจากโคโลนี อายุ 2 วัน ลากเส้นตรงให้ห่างจาก ขอบจาน 2.5 เซ็นติเมตร ด้านตรงข้ามในแนวเส้นผ่าศูนย์กลาง (รูปที่ 1) แต่ละกรรมวิธีมี 10 ซ้ำ บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน วัดรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส ในจานทดสอบและจานควบคุม ซึ่งไม่ปลูกเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (รูปที่ 3) นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย เชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนส (percent inhibition of radial growth=PIRG) โดยมีสูตรคำนวณ (Tronsmo., 1989) ดังนี้

PIRG = [(R1 - R2)/R1 x 100]

R1 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* ในจานควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีโคโลนีของเชื้อรา *C. capsici* ในจานทดสอบ

คัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีประสิทธิภาพอย่างน้อย 4 ไอโซเลทไปทดสอบประสิทธิภาพในเรือนทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในเรือนทดลอง

<u>การเตรียมพืชทดสอบ</u>

เพาะต้นกล้าพริก เมื่อต้นกล้ามีอายุประมาณ 30 วัน ย้ายต้นกล้าลงปลูกในถุงดำเพาะชำหรือกระถาง จากนั้นบำรุงดูแลรักษาจนต้นพริกออกดอกและติดผล

<u>การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *C. capsici* และปลูกเชื้อ</u>

เลี้ยงเชื้อรา *C. capsici* บนอาหาร PCA เป็นเวลา 7-14 วัน ล้างสปอร์ด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับให้มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราที่ได้ไปปลูกเชื้อลงบนผลพริกโดยการพ่น (spray inoculation)

การเตรียม cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis*

นำแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ B23/2, 20W15, 20W19 และ19W6 มาเลี้ยงบนอาหาร PSA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทำเป็น cell suspension ปรับให้มีความเข้มข้น 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำมาพ่นเมื่อเริ่มพบอาการของโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่สองห่างจากครั้งแรก 7 วัน

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 7 กรรมวิธี

กรรมวิธีที่ 1 พ่น *B. subtilis* B23 /2

กรรมวิธีที่ 2 พ่น *B. subtilis* 20W15

กรรมวิธีที่ 3 พ่น *B. subtilis* 20W19

กรรมวิธีที่ 4 พ่น *B. subtilis* 19W6

กรรมวิธีที่ 5 พ่น *B. subtilis* 20W16

กรรมวิธีที่ 6 พ่น carbendazim 50 % W/V SC อัตรา 20 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อ *C. capsici* +พ่นน้ำเปล่า

วิธีการเก็บข้อมูลการทดลอง

ประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค โดยเก็บผลพริกในระยะเก็บเกี่ยว นับจำนวนผลพริกทั้งหมดและผลพริกที่เป็นโรคแอนแทรคโนส นำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค บันทึกสภาพแวดล้อมและการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ขณะทำการทดลอง บันทึกการเกิดพิษต่อพืช วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติที่เหมาะสม

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม พ.ศ. 2556 สิ้นสุด กันยายน พ.ศ. 2558
  สถานที่ทำการทดลอง เรือนทดลองปลูกพืชกลุ่มวิจัยโรคพืช
  ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
  กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 3.2.7การควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้แช่แข็ง (Freezer) –20 องศาเซลเซียส

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter, Shaker, Spectrophotometer ยี่ห้อ Hitachi model 2001

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

5. วัสดุเกษตร ได้แก่ เมล็ดมะเขือเทศ เมล็ดพริก ดิน ถุงเพาะเมล็ด ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยคอก สารกำจัดแมลง สารกำจัดวัชพืช และสารป้องกันกำจัดโรคพืช

- วิธีการ

การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no.2 และ UB no.25 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพแปลงทดลอง ทำการทดสอบที่อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง ในปี 2557-2558

การเตรียมแปลงทดลอง โดยอบดินด้วยยูเรียผสมกับปูนขาวอัตรา 80 ต่อ 800 กิโลกรัม ต่อพื้นที่ 1 ไร่ เพื่อฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนอยู่ในดิน หลังจากอบดิน 3 สัปดาห์ จึงเพิ่มปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูกให้มีแบคทีเรีย *R. solanacearum* สม่ำเสมอ โดยปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดา ซึ่งอ่อนแอต่อโรคเหี่ยวลงในแปลงทดสอบ เมื่อต้นมะเขือเทศอายุ 21 วัน ปลูกด้วยแบคทีเรีย *R. solanacearum* ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงบนต้นมะเขือเทศ โดยวิธี clipping method ทิ้งไว้ 1 เดือน เมื่อต้นมะเขือเทศแสดงอาการเหี่ยว จึงสับต้นมะเขือเทศให้ละเอียดและปล่อยให้

ย่อยสลายในดิน จากนั้นเตรียมแปลงทดลองจำนวน 20 แปลงย่อย ขนาดแปลงละ 8.0 x 1.5 เมตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพแปลงทดลองต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริก วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ มี 5 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 15 วัน

กรรมวิธีที่ 2 รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 15 วัน

กรรมวิธีที่ 3 รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* UB no.2 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 15 วัน

กรรมวิธีที่ 4 รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* UB no.25 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 15 วัน

กรรมวิธีที่ 5 ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* (control)

ทำการย้ายปลูกต้นกล้าพริกอายุ 28 วัน ลงในแปลงทดลอง โดยใช้ระยะปลูก 50x50 ซม. ปลูกพริก 30 ต้นต่อ 1 แปลงย่อย และรดด้วยสารละลายผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* ตามกรรมวิธีที่กำหนดทุก 15 วัน

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ตรวจเช็คปริมาณเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในแปลงปลูก โดยเก็บตัวอย่างดินทุกเดือน
2. ตรวจเช็คปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในแปลงปลูก โดยเก็บตัวอย่างดินทุกเดือน
3. ตรวจนับต้นที่แสดงอาการของโรคทุกเดือนทดลองโดยวิธีทางสถิติ

- **เวลาและสถานที่**

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2558 กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และแปลงปลูกพริกของศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง

การทดลองที่ 3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani*

วิธีดำเนินการทดลอง

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ย จานแก้วเลี้ยงเชื้อ แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นแก้วปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA), Potato Sucrose Agar (PSA), Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Corn Leaf Ager (CLA)
3. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope) กล้อง Stereoscopic microscope และกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์
4. เอกสารและตำราเกี่ยวกับชนิดและภาพ (monograph) ของเชื้อรา
5. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
6. เชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตง
7. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis*
8. เมล็ดพืชตระกูลแตง ได้แก่ เมล็ดแตงกวา เมล็ดแตงโม และเมล็ดมะระ

วิธีการทดลอง

1. การทดสอบการผลของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 10 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA ทดสอบโดยวิธี Dual plate technique ดังนี้

1.1 เลี้ยงเชื้อรา *F. solani* ทดสอบบนอาหาร PDA เป็นเวลา 5 วัน และเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* แต่ละโอโซเลทบนอาหาร PSA เป็นเวลา 3 วัน

1.2 ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยของเชื้อรา *F. solani* ที่เจริญบนอาหารวุ้น PDA วางบนกึ่งกลางจานอาหาร PDA จากนั้นใช้ห่วงลวด (loop) แตะเชื้อ *B. subtilis* ที่เจริญบนอาหารวุ้น PSA นำมาขีดเป็นเส้นตรงยาว 2 เซนติเมตร ขนาน 4 ด้านของชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *F. solani* โดยมีระยะห่างจากชิ้นวุ้นเชื้อรา 2 เซนติเมตร

1.3 ตรวจผลการสร้างพื้นที่การยับยั้งการเจริญของเชื้อ Bacillus sp. ที่มีต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* โดยวัดพื้นที่ inhibition zone หรือ clear zone ที่เกิดขึ้น

1.4 คัดเลือกเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 5 ไอโซเลท ที่มีขนาดความกว้างของ inhibition zone หรือ clear zone มากกว่าไอโซเลทอื่น ไปทำการทดสอบในโรงเรือนต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการ soil infestation ดังนี้

2.1 วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Completed Block Design) มี 7 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมีต้นแตงกวา 20 ต้น (กระถาง) ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 17G15
กรรมวิธีที่ 2 ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 17G18
กรรมวิธีที่ 3 ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 20W12
กรรมวิธีที่ 4 ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 20W16
กรรมวิธีที่ 5 ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 22W10
กรรมวิธีที่ 6 ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
กรรมวิธีที่ 7 ดินไม่คลุกเชื้อรา *F. solani* + ไม่ราด *B. subtilis*

2.2 เตรียมดินผสมเพื่อใช้ทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของแตงกวาในเมล็ดข้าวฟ่าง ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อรา มาคลุกเคล้ากับดินปลูกพืชที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พักดินไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ แล้วจึงนำใส่กระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 นิ้ว

2.3 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PSB (Potato Sucrose Broth) วางขวดบนเครื่องเขย่า (shaker) เปิดอัตราการเขย่าด้วยความเร็วต่ำประมาณ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 เตรียม cell suspension ของเชื้อ *B. subtilis* ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำ cell suspension ของเชื้อ *B. subtilis* ราดดินที่มีเชื้อรา *F. solani* ในอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง

2.5 หยอดเมล็ดแตงกวาที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite) ลงดินในกระถาง ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำมีต้นแตงกวา 20 ต้น (กระถาง) โดยมีระยะปลูกระหว่างต้น และระหว่างแถว 30 เซนติเมตร จำนวน 1 เมล็ดต่อ 1 หลุม ทำการทดลอง 4 แปลง (ซ้ำ) โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และกรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis*

2.6 ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก ที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังราดดินด้วยเชื้อ *B. subtilis* แล้วนำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวา เปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

3. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation ดังนี้</u>

3.1. เตรียมดินผสมเพื่อใช้ทดสอบ โดยเลี้ยงเชื้อรา *F. solani* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงในเมล็ดข้าวฟ่าง ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ (flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อรา มาคลุกเคล้ากับดินในแปลงปลูกแตง ขนาด 10x1.20 เมตร พักดินไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้เชื้อราฟื้นตัวและเจริญอยู่ในดินได้

3.2 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ซึ่งผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือน แล้วว่าสามารถควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงในสภาพโรงเรือนปลูกพืชได้ ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PSB (Potato Sucrose Broth) วางขวดบนเครื่องเขย่า (shaker) เปิดอัตราการเขย่าด้วยความเร็วต่ำประมาณ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 เตรียม cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis.* ทดสอบ ที่ความเข้มข้นประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร นำ cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis.* ราดดินที่มีเชื้อรา *F. solani* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร

3.4 หยอดเมล็ดพืชตระกูลแตงที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite) ลงในดินที่เตรียมไว้ ในแปลงขนาด 2.0x1.20 ตารางเมตร โดยมีระยะปลูกระหว่างต้น และระหว่างแถว 30 เซนติเมตร จำนวน 1 เมล็ดต่อ 1 หลุม ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ (แปลง) โดยมีกรรมวิธีเปรียบเทียบ 3 กรรมวิธีคือ กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ กรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* และกรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยคลุกดินปลูกเชื้อด้วย *F. solani* และราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. solani* (เทอร์ราคลอร์ : Terraclor) ดังนี้

วางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Completed Block Design) มี 4 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ ๆ ละ 1 แปลงทดลองๆ ขนาด 2.0x1.20 ตารางเมตร ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1-4 คลุกเชื้อรา *F. solani* ในดินปลูก + *B. subtilis* (BS1, BS2, BS3 และ BS4) ความหนาแน่นของเชื้อ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 กรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยคลุกเชื้อรา *F. solani* ในดินปลูกแตง แล้วไม่ราด *B. subtilis*

กรรมวิธีที่ 6 กรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยไม่คลุกดินด้วย *F. solani* และไม่ราดด้วยแบคทีเรีย *B. subtilis* (ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

กรรมวิธีที่ 7 กรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยคลุกดินปลูกเชื้อด้วย *F. solani* และราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา *F. solani* (เทอร์ราคลอร์ : Terraclor)

3.5 ตรวจผลโดยนับจำนวนต้นเหี่ยวหรือต้นที่ไม่งอก ที่ 7, 14 และ 21 หลังจากปลูกพืชตระกูลแตงได้ 1 สัปดาห์ แล้วคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเกิดโรคเปรียบเทียบกับจำนวนต้นแตงทั้งหมด และวิเคราะห์การทดลองในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง

<u>เวลาและสถานที่</u>

เวลา : เริ่มต้น ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กันยายน 2557

สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

กิจกรรมย่อยที่ 3.3 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.3.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. สาเหตุโรคยางไหล

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ
2. กล้องจุลทรรศน์
3. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ
4. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก กล่องเก็บความเย็น ปากกา กรรไกร ฯลฯ
5. กล้องถ่ายภาพ

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลและการแยกเชื้อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จากแหล่งปลูกในแปลงเกษตรกร โดยเก็บตัวอย่างต้นพืชที่แสดงอาการเป็นโรค นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method จากส่วนของขอบแผลจากพืชที่เป็นโรค โดยตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ทุกขั้นตอนปฏิบัติงานโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เก็บตัวอย่างต้นพืชที่เป็นโรค และต้นที่ปกติจากแหล่งปลูกของเกษตรกร เพื่อนำมาแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี leaf washing technique และเก็บตัวอย่างดินมาแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี Soil dilution plate โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม เมื่อพบมีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้บันทึกลักษณะของเชื้อ และแยกเชื้อเก็บไว้ให้บริสุทธิ์

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคยางไหลในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ในข้อ 2 มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 5 วัน ใช้ cork borrer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร NGA อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราสาเหตุโรค โดยขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีความยาว 1 ซ.ม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซ.ม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำค่าที่วัดได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ดี มีระดับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป เพื่อนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

เวลาสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2553

สิ้นสุด กันยายน 2555

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกแตงของเกษตรกร

การทดลองที่ 3.3.2 การคัดเลือกและทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลอง

วีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบผง
2. แปลงทดลองเกษตรกรผู้ปลูกแตงเมล่อน จ. สุพรรณบุรี
3. ถังพ่นสารแบบโยกสะพายหลัง
4. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น ถุงพลาสติก กล่องเก็บความเย็น ปากกา กรรไกร ฯลฯ
5. อุปกรณ์เครื่องแก้วในห้องปฏิบัติการ
6. กล้องถ่ายภาพ
7. ป้ายแปลง
8. สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช

- วิธีการ

1.การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Dydimella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลอง

1.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์รูปแบบผง

เลี้ยงขยายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพที่คัดเลือกได้ จำนวน 4 ไอโซเลท เลี้ยงในอาหาร NGB ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง ปรับความเข้มข้น 10^8 cfu/ml โดยการวัดค่า OD ให้ได้ 0.2 และนำเชื้อที่ได้ไปเตรียมเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในรูปแบบผงเชื้อ ตามวิธีการของ ณัฏฐิมาและคณะ (2551) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

1.2 เตรียมแปลงทดลองขนาด 2x5 เมตร จำนวน 20 แปลงทดลองย่อย และปลูกแตงเมล่อน ตามระยะปลูก 50x50 เซนติเมตร

1.3 วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ กรรมวิธีคือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในการทดสอบปี 2557 จำนวน 3 ไอโซเลท และจาก culture collection 1 ไอโซเลท คือ

T1. BSS32 ใส่โคนต้น อัตรา 3 กรัมต่อต้น และสลับการพ่น อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T2. BSS37 ใส่โคนต้น อัตรา 3 กรัมต่อต้น และสลับการพ่น อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T3. BSS65 ใส่โคนต้น อัตรา 3 กรัมต่อต้น และสลับการพ่น อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T4. AS013 ใส่โคนต้น อัตรา 3 กรัมต่อต้น และสลับการพ่น อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร

T5. control (ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์)

1.4 เมื่อพืชทดสอบอายุ 1 เดือน นำผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในแต่ละกรรมวิธี จำนวน 3 กรัม ใส่ลงดินบริเวณโคนต้น และสลับกับการพ่นผงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ตามแผนการทดลองที่วางไว้ ทุก 7 วัน อย่างน้อย 4 ครั้ง ทำการเช็คและประเมินการเกิดโรคยางไหล จำนวน

10 ต้น ต่อซ้ำ บันทึกผลการทดสอบโดยทำการประเมินความรุนแรงของโรคก่อนการใส่เชื้อลงต้น ทำการเช็คต้นที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค และประเมินโรคที่ใบ โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 = ไม่แสดงอาการของโรค
ระดับ 2 = แสดงอาการเป็นโรค 1 - 10 % ของพื้นที่ใบทั้งต้น
ระดับ 3 = แสดงอาการเป็นโรค 11 - 25 % ของพื้นที่ใบทั้งต้น
ระดับ 4 = แสดงอาการเป็นโรค 26 - 50 % ของพื้นที่ใบทั้งต้น
ระดับ 5 = แสดงอาการเป็นโรคมากกว่า 51 % ของพื้นที่ใบทั้งต้น

และนำค่าที่ได้มาหาระดับความรุนแรงของโรค และนำข้อมูลที่ได้คิดวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี DMRT

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2555
สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
แปลงปลูกแตงเมล่อนของเกษตรกร จ.สุพรรณบุรี

การทดลองที่ 3.3.3 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ฟลาสก์ ลูป ตะเกียงแอลกอฮอล์

2. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ เช่น ปิเปต เครื่องชั่ง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven)

3. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. เชื้อแบคทีเรีย *B. gladioli* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

5. สารป้องกันกำจัดโรคพืช thiram 80% WG

6. กล้วยไม้

7. เครื่องพ่นมือ

- วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 การแยกเชื้อจากวัสดุปลูก

แช่วัสดุปลูกจำนวน 10 กรัม ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นที่ 10^{-2}, 10^{-4} และ 10^{-6} เท่า มากระจายบนอาหาร PSA และ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เก็บเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การแยกเชื้อจากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้

นำส่วนราก ใบ และดอกของกล้วยไม้จากแปลงปลูกกล้วยไม้เกษตรกร มาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยเขย่าในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร นาน 30 นาที จากนั้นจึงนำสารแขวนลอยมาทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution และดูดสารแขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^{-3} และ10^{-4} เท่า ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหาร PSA และ TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เก็บเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การเตรียมเชื้อจาก culture collection

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร TSA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดและจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยามาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ด้วยวิธี disc diffusion โดยเลี้ยงเชื้อ *B. gladioli* บนอาหาร NA เพื่อใช้เตรียม cell suspension ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^{8} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ดูดเชื้อ *B. gladioli* ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมลงในหลอดที่บรรจุอาหาร NA ที่หลอมไว้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงในจานอาหาร NA ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง วางกระดาษกรองเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีเชื้อ *B. gladioli* ผสม จานละ 5 ชิ้น ดูดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง โดยหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำ 4 ซ้ำ แล้วตรวจสอบบริเวณใส (clear inhibition zone) หลังบ่มเชื้อ 48 ชั่วโมง หาค่าเฉลี่ยของบริเวณใสและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* 5 ไอโซเลท เพื่อใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลอง

3.1 การเตรียมเชื้อ *B. gladioli* สำหรับปลูกเชื้อบนกล้วยไม้

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 มีความเข้มข้นเชื้อประมาณ $1.0x10^{8}$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ปลูกเชื้อบนต้นกล้วยไม้โดยใช้วิธีการพ่น แล้วใช้ถุงพลาสติกพ่นน้ำละอองฝอยคลุมต้นกล้วยไม้เพื่อเพิ่มความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก

3.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สำหรับพ่นบนกล้วยไม้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีจำนวน 5 ไอโซเลท ในอาหาร TSB บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับค่าความขุ่นของเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^{9} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ก่อนนำไปพ่นให้ทั่วต้นกล้วยไม้ด้วยเครื่องพ่นมือ

3.3 การวางแผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำๆ ละ 15 ต้น โดยมีกรรมวิธีทดลองดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS3
กรรมวิธีที่ 2 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS5
กรรมวิธีที่ 3 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS6
กรรมวิธีที่ 4 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS23
กรรมวิธีที่ 5 พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BS40
กรรมวิธีที่ 6 พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช thiram 80% WG อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 พ่นด้วยน้ำเปล่า
ทำการพ่นให้ทั่วต้นกล้วยไม้ทุกๆ 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง

3.4 การบันทึกผลการทดลอง

3.4.1 ตรวจสอบการเกิดโรคของกล้วยไม้ก่อนพ่นทุกครั้ง และหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 และ 14 วัน ประเมินระดับความรุนแรงของโรคทุกใบในแต่ละต้น จำนวน 15 ต้นต่อซ้ำ โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ใบไม่ปรากฏอาการของโรค
ระดับ 2 ใบปรากฏอาการของโรค 1-5 % ของพื้นที่ใบ
ระดับ 3 ใบปรากฏอาการของโรค 6-10 % ของพื้นที่ใบ
ระดับ 4 ใบปรากฏอาการของโรค 11-25 % ของพื้นที่ใบ
ระดับ 5 ใบปรากฏอาการของโรค 26-50 % ของพื้นที่ใบ
ระดับ 6 ใบปรากฏอาการของโรค 51-100 % ของพื้นที่ใบ

3.4.2 นำค่าความรุนแรงที่ประเมินได้มาหาค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค

3.4.3 วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ โดยทำการศึกษาลักษณะรูปร่างทางสรีรวิทยาของเชื้อ ทดสอบแกรม การสร้างสปอร์และการย้อมติดสี Malachite green และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิด โดยศึกษาตามคู่มือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition และ Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria Third Edition

- เวลาและสถานที่

ต.ค. 56 – ก.ย. 58 ที่ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลอง กลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และสวนกล้วยไม้ของเกษตรกร

การทดลองที่ 3.3.4 การควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. กล้วยไม้พันธุ์แวนดา
2. แบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*
3. อาหารที่ใช้ในการทดสอบและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น PSA , NGA, King' medium B agar เป็นต้น
4. สารเคมีไทแรม (Thiram) (สารเคมีเปรียบเทียบ)

- วิธีการ

1. การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุปลูก และส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้

1.1 การแยกเชื้อจากวัสดุปลูก แช่วัสดุปลูกจำนวน 10 กรัม ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 30 นาที นำมาทำให้เจือจางโดย วิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1}-10^{-6} จากนั้นนำสารละลายที่ได้ 0.1 มิลลิลิตร ของความเข้มข้นที่ 10^{-2}, 10^{-4} และ 10^{-6} มากระจายบนอาหาร King's medium B agar (KB) และ Nutrient glucose agar (NGA) ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เก็บเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 การแยกเชื้อจากส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ นำส่วนราก ใบ และดอกของกล้วยไม้จากแปลงปลูกกล้วยไม้เกษตรกร มาแยกหาเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี leaf wash technique โดยหั่นส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ให้เป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 100 มิลลิลิตร หยด tween 80 1-2 หยด นำไปเขย่านาน 30 นาที จากนั้นจึงนำสารแขวนลอยในแต่ละส่วนมาทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution และดูดสารแขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^{-3} และ10^{-4} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มากระจายบนอาหาร King's medium B agar (KB) และ Nutrient glucose agar (NGA) ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อมีเชื้อเจริญที่บริเวณผิวหน้าอาหาร ทำการบันทึกลักษณะและเลือกเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะแตกต่างกันลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เก็บเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* ในห้องปฏิบัติการ

2.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 40 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการผลิตสาร secondary metabolites ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ด้วยวิธี disc diffusion method โดยเลี้ยงเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เตรียม cell suspension โดยปรับค่าความขุ่นของเซลล์ให้มีความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10^{8} หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ดูด suspension ของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมลงในขวดที่บรรจุอาหาร NGA ที่หลอมไว้อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง วางกระดาษกรองเบอร์ 1 (paper disc) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ที่มีเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* ผสมจานละ 5 ชิ้น ดูด suspension แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรอง โดยหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ทำ 4 ซ้ำ วัดความกว้างของบริเวณใส (clear inhibition zone) คำนวณหาค่าเฉลี่ย หลังปลูกเชื้อ 48 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. avenae* subsp. *cattleyae* เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลองต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ในเรือนปลูกพืชทดลอง

ทำการทดลองโดยใช้กล้วยไม้สกุลแวนดา วางแผนการ ทดลองแบบ CRD มี 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 15 กระถาง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BVN-5
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BVN-9
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BVR-37
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BVS-43
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทที่ BVB-2
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อและใช้สารเคมี thiram 80% WG อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อและใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)

3.1 การเตรียมเชื้อ *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สำหรับปลูกเชื้อบนกล้วยไม้

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Wakomoto's medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำเชื้อแบคทีเรียละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ แล้ววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometor ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ปรับให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.2 ($1.0x10^8$ หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร) ปลูกเชื้อทดสอบด้วยวิธีสเปรย์สารละลายเชื้อแบคทีเรียบนต้นกล้วยไม้ และใช้ถุงพลาสติกที่สเปรย์น้ำคลุมต้นกล้วยไม้เพื่อเพิ่มความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก

3.2 การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) เป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไปเขย่าในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารละลายเชื้อที่ได้ไปผสมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับความเข้มข้นของเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^9 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร ก่อนนำไปสเปรย์ให้ทั่วต้นกล้วยไม้ และใช้ถุงพลาสติกที่สเปรย์น้ำคลุมต้นกล้วยไม้เพื่อเพิ่มความชื้น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำถุงพลาสติกออก

2. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ในสภาพเรือนทดลอง ทดสอบแกรม และการสร้างสปอร์ เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป api 50 CHB

การบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบการเกิดโรคของกล้วยไม้ก่อนพ่นทุกครั้ง ประเมินระดับความรุนแรงของทุกใบในแต่ละต้น จำนวน 15 ต้นต่อซ้ำ โดยแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 6 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ใบไม่ปรากฏอาการของโรค
ระดับ 2 ใบปรากฏอาการของโรคร้อยละ 1-5 ของพื้นที่ใบ
ระดับ 3 ใบปรากฏอาการของโรคร้อยละ 6-10 ของพื้นที่ใบ
ระดับ 4 ใบปรากฏอาการของโรคร้อยละ 11-25 ของพื้นที่ใบ
ระดับ 5 ใบปรากฏอาการของโรคร้อยละ 26-50 ของพื้นที่ใบ
ระดับ 6 ใบปรากฏอาการของโรคมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ใบ

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำค่าการประเมินระดับความรุนแรงของโรคที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธีทางสถิติ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2557 สิ้นสุด กันยายน 2558
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 3.3.5 การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ *Rhizoctonia solani* โดยชีววิธี

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างโรคพืช ได้แก่ กรรไกรตัดแต่งกิ่ง ถุงพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปากกาเคมี

2. สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ แอธิลแอลกอฮอล์ 75%

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), water agar (WA)

4. วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดดูแรน บีกเกอร์ กระบอกตวง ใบมีดผ่าตัด เข็มเขี่ยปลายแหลม สไลด์ cover slip

5. ตู้ปลอดเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบความร้อน เครื่องชั่ง

6. กล้องจุลทรรศน์

7. เมล็ดพันธุ์ข้าวโพด

8. วัสดุเกษตร เช่น ปุ๋ยเคมี สารกำจัดวัชพืช

วิธีการ

1. การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ*R. solani* โดยชีววิธี

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อรา *R. solani* และการแยกเชื้อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *R. solani* จากแหล่งปลูกในไร่เกษตรกร นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method จากส่วนของขอบแผลจากพืชที่เป็นโรค โดยตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก ฟอกฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อก 10 เปอร์เซ็นต์แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงวางบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar; PDA) ทุกขั้นตอนปฏิบัติงานโดยเทคนิคปลอดเชื้อ นำไปบ่มไว้ในอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส หลังจากที่มีเชื้อเจริญออกมาจากขอบแผล ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture

2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *R. solani* ในแปลงทดลอง

2.1 การปลูกพืชทดสอบ

ปลูกข้าวโพดพันธุ์อ่อนแอในแปลงโดยมีระยะปลูก 0.75x0.5 เมตร จำนวน 2 ต้น/หลุม ขนาดแปลงย่อย 3.0x6.5 เมตร จำนวน 4 แถว โดยใช้ระยะห่างระหว่างแถวเท่ากับ 75 เซ็นติเมตร ระยะระหว่างต้น 25 เซ็นติเมตร จำนวน 1 ต้นต่อหลุม ใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ ก่อนปลูก และใส่ปุ๋ยยูเรีย อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อข้าวโพดอายุได้ 25 วันหลังปลูก

2.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อรา R. solani เพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ

นำเมล็ดข้าวฟ่าง มาแช่น้ำนานประมาณ 18 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำที่แช่เมล็ด 3-4 ครั้ง เพื่อให้เมล็ดสะอาด จากนั้นจึงนำเมล็ดบรรจุลงในถุงพลาสติกทนความร้อน ปริมาณ 2 ใน 3 ของภาชนะ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกครั้งในวันถัดมา เขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อเจริญอยู่ลงไปในถุงข้าวฟ่างที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเริ่มมีการเจริญของเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่าง เขย่าถุงเพื่อให้เชื้อกระจายไม่เกาะเป็นก้อนแข็ง บ่มไว้เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเชื้อเจริญอยู่มาบุบให้แตกเพื่อให้มีขนาดเล็กลงและมีความสม่ำเสมอ นำเชื้อที่เตรียมได้ไปปลูกเชื้อให้ข้าวโพดเมื่อข้าวโพดอายุได้ 21 วัน โดยวิธีหยอดยอด

2.3 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

นำเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (Tryptone Soya Bloth) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในรูปผงเชื้อ เพื่อนำไปพ่นบนต้นข้าวโพดทดสอบต่อไป

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

<u>แปลงทดลองที่ 1</u> การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพแปลงทดลอง

เมื่อข้าวโพดอายุ 21 วัน ปลูกเชื้อ *R. solani* หลังจากนั้น 7 วันพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และพ่นทุก 7 วัน รวมจำนวน 4 ครั้ง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี มีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ XM 40 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 14 G 12 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 18 G 6 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ Cb 7 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 14 W 8 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 11 W 12 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 20 W 7 อัตรา	50	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8 พ่นน้ำเปล่า		

การประเมินความรุนแรงของโรค

บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคเฉพาะ 2 แถวกลาง จำนวน 20 ต้น/ซ้ำ ครั้งแรกก่อนที่จะมีการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ครั้งที่ 2 ครั้งต่อไปก่อนการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทุกครั้ง และหลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย 7 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคโดยประเมินพื้นที่การเกิดโรคทั้งต้น

<u>แปลงทดลองที่ 2</u> การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

นำผลการทดลองจากแปลงทดลองที่ 1 มาทดสอบเพื่อหาอัตราและระยะเวลาในแปลงทดลองที่ 2 ดังนี้ เมื่อข้าวโพดอายุ 21 วัน ปลูกเชื้อ *R. solani* หลังจากนั้น 5 วันพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์และพ่นทุก 5 วัน รวมจำนวน 4 ครั้ง รวมจำนวน 4 ครั้ง

วางแผนการทดลองแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ 8 กรรมวิธี มีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ XM 40 อัตรา	60	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ XM 40 อัตรา	80	กรัม/20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 14 W 8 อัตรา	60	กรัม/ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 14 W 8 อัตรา	80	กรัม./ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 20 W 7 อัตรา	60	กรัม/ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6 จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 20 W 7 อัตรา	80	กรัม/ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7 pyraclostrobin 25% W/V อัตรา	15	มล./ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 8 พ่นน้ำเปล่า		

การประเมินความรุนแรงของโรค

บันทึกระดับความรุนแรงของการเกิดโรคเฉพาะ 2 แถวกลาง จำนวน 20 ต้น/ซ้ำ ครั้งแรกก่อนที่จะ
มีการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ครั้งที่ 2 และหลังพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย 5 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคโดยประเมินพื้นที่การเกิดโรคทั้งต้น

2. 5. เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติที่เหมาะสม รายงานผลการทดลอง
เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2556 – กันยายน 2558

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

แปลงปลูกพืชของเกษตรกร อ. แม่แตง จ. เชียงใหม่

แปลงปลูกพืชของเกษตรกร อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

กิจกรรมย่อยที่ 3.4 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช

การทดลองที่ 3.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ ถ้วยนับตัวอย่างสไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช สารกำจัดแมลง ปุ๋ยเคมี

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่าง ดิน หัว รากพืช และการตรวจหา *P. penetrans*

เก็บตัวอย่างดิน ราก และหัวพืช ในแปลงปลูกพืชที่มีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปม เช่น พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง มันขี้หนู เป็นต้น โดยเก็บดินบริเวณรากพืชลึกประมาณ 15-20 เซนติเมตร จำนวน 20 จุดต่อ 1 ตัวอย่างบันทึกพิกัดของจุดที่เก็บตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน และตรวจหาตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะ แล้วนำไปเลี้ยงในรากมะเขือเทศเพื่อเพิ่มจำนวนสปอร์ แยกตัวเต็มวัยเพศเมียจากส่วนหัวของพืช บดในน้ำกลั่น นำของเหลวส่วนบนไปตรวจหา *P. penetrans* โดยการใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเหยื่อล่อ สำหรับตัวอย่างรากพืชจะผึ่งให้แห้งในที่ร่มแล้วบดเป็นผงละเอียด นำตัวอย่างรากบด 0.1 กรัมปั่นเหวี่ยงในน้ำกลั่นที่ 3,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วนำของเหลวส่วนบนไปตรวจหา *P. penetrans* โดยการใช้ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมเป็นเหยื่อล่อ

การเตรียมตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม

เลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมในรากมะเขือเทศในกระถาง เมื่อต้นมะเขือเทศอายุประมาณ 60 วันแยกไข่ไส้เดือนฝอยโดยการตัดรากปมเป็นชิ้นขนาดยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และเขย่าใน 0.52 % Sodium Hypochlorite (คลอร็อก 10%) และเก็บไข่ไส้เดือนฝอยโดยการล้างผ่านตะแกรงที่มีขนาดช่อง

25 ไมโครเมตร ด้วยน้ำสะอาด (Hussey and Barker, 1973) นำไข่ไส้เดือนฝอยใส่ลงบนตะแกรงไนลอนขนาดเล็กที่มีขนาดช่องประมาณ 25 ไมโครเมตร ซึ่งวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำตัวอ่อนระยะที่สองซึ่งฟักออกมาจากไข่อายุไม่เกิน 48 ชั่วโมงไปใช้ในการทดลอง

การเตรียมสปอร์ของ *P. penetrans* เพื่อใช้ในการทดลอง

เลี้ยงเพิ่มปริมาณสปอร์ของ *P. penetrans* โดยการนำตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยที่มี สปอร์ของ *P. penetrans* ติดอยู่ที่ผนังลำตัว เลี้ยงในรากมะเขือเทศที่ปลูกในดินนอบฆ่าเชื้อ (Stirling and Wachtel, 1980) นำรากผึ่งให้แห้งในที่ร่ม แล้วเก็บใส่ถุงพลาสติกใสเมื่อมะเขือเทศอายุ 60 วัน ตัดรากเป็นท่อนสั้นๆ และบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า นำผงราก 100 มิลลิกรัมบดกับน้ำเล็กน้อยด้วยโกร่งบดตัวอย่าง เติมน้ำลงในตัวอย่างและกรองส่วนบนผ่านตะแกรงขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร นำเซลแขวนลอยของ *P. penetrans* ใส่ในบีกเกอร์พลาสติกปรับปริมาตร และวัดความเข้มข้นของเซลแขวนลอยของสปอร์โดยใช้ Haemacytometer

การทดสอบประสิทธิภาพของ *P. penetrans* 2 ไอโซเลตที่เลี้ยงเพิ่มปริมาณได้สำเร็จในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (ปีงบประมาณ 2556)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ไม่ใส่สารเคมี และ *P. penetrans* (Control)

กรรมวิธีที่ 2 คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลตจากหัวมันฝรั่ง (PP122) อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง

กรรมวิธีที่ 3 คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลตจากรากพริก (PPR70) อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง

กรรมวิธีที่ 4 คลุกดินด้วยสาร carbofuran 3G อัตรา 0.1 กรัมต่อกระถาง

ย้ายมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 3-4 สัปดาห์ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ที่ใส่ดินนอบฆ่าเชื้อหนัก 200 กรัมที่คลุกด้วยผงสปอร์ของ *P. penetrans* จำนวน 10^6 สปอร์ต่อกระถางใส่ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 400 ตัว ลงในกระถาง โดยเจาะดินรอบต้นมะเขือเทศจำนวน 4 ช่อง ใช้ไปเปตหยอดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำลงในช่องแล้วกลบดินปิด ตรวจผลการทดลอง 45 วันหลังใส่ไส้เดือนฝอย โดยนับจำนวนปม จำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนรากมะเขือเทศ และชั่งน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศ

การทดสอบประสิทธิภาพของ *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ไอโซเลตจากมันฝรั่ง (ปีงบประมาณ 2557)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 11 กรรมวิธี 5 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 *P. penetrans* ไอโซเลต PP121 (มันฝรั่ง) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 2 *P. penetrans* ไอโซเลต PP689 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 3 *P. penetrans* ไอโซเลต PP695 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 4 *P. penetrans* ไอโซเลต PP705 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 5 *P. penetrans* ไอโซเลต PP720 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 6 *P. penetrans* ไอโซเลต PP722 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 7 *P. penetrans* ไอโซเลต PP735 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 8 *P. penetrans* ไอโซเลต PPR70 (พริก) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง

กรรมวิธีที่ 9 สาร cadusafos 10 G อัตรา 0.1 กรัมต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 10 ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 11 ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยและสารใดๆ

ย้ายมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 3-4 สัปดาห์ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อหนัก 200 กรัมที่คลุกด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* อัตรา 10^6 สปอร์ต่อกระถาง ใส่ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 600 ตัว ลงในกระถาง โดยเจาะดินรอบต้นมะเขือเทศจำนวน 4 ช่อง ใช้ไปเปตหยอดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่แขวนลอยอยู่ในน้ำลงในช่องแล้วกลบดินปิด ตรวจผลการทดลอง 45 วันหลังใส่ไส้เดือนฝอย โดยชั่งน้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักราก นับจำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนรากมะเขือเทศ นับจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในราก นับจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* โดยสุ่มตัวเต็มวัยเพศเมียจำนวน 20 ตัว แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย นับจำนวนตัวอ่อนระยะที่สองทั้งหมดในดิน และจำนวนตัวอ่อนที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* บนผนังลำตัว

การทดสอบประสิทธิภาพของ *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ไอโซเลตจากพริกไทย (ปีงบประมาณ 2558)

ปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกับการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ไอโซเลตจากมันฝรั่ง โดยทดสอบ *P. penetrans* 4 ไอโซเลต และปรับลดอัตราสาร cadusafos 10G ลงเป็น 0.01 กรัมต่อกระถาง เนื่องจากว่าความเข้มข้นของสารในการทดลองในปี 2557 สูงเกินไป ทำให้มีจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายรากน้อยมาก วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีต่างๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 *P. penetrans* ไอโซเลต PP122 (มันฝรั่ง) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 2 *P. penetrans* ไอโซเลต PP705 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 3 *P. penetrans* ไอโซเลต PP720 (มันขี้หนู) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 4 *P. penetrans* ไอโซเลต PPR70 (พริก) 10^6 สปอร์ต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 5 สาร cadusafos 10 G อัตรา 0.01 กรัมต่อกระถาง
กรรมวิธีที่ 6 ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว
กรรมวิธีที่ 7 ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยและสารใดๆ

ย้ายมะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 3-4 สัปดาห์ปลูกลงในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว ที่ใส่ดินอบฆ่าเชื้อหนัก 200 กรัมที่คลุกด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* อัตรา 10^6 สปอร์ต่อกระถาง ใส่ตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวน 600 ตัว ลงในกระถาง โดยเจาะดินรอบต้นมะเขือเทศจำนวน 4 ช่อง ใช้ไปเปตหยอดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยที่แขวนลอยอยู่ในน้ำลงในช่องแล้วกลบดินปิด ตรวจผลการทดลอง 45 วันหลังใส่ไส้เดือนฝอย โดยชั่งน้ำหนักแห้งต้น น้ำหนักราก นับจำนวนกลุ่มไข่ทั้งหมดบนรากมะเขือเทศ นับจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในราก นับจำนวนตัวอ่อนระยะที่สองทั้งหมดในดิน และจำนวนตัวอ่อนที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* บนผนังลำตัว

วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธี Analysis of Variance และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT แปลงข้อมูลจำนวนนับให้อยู่ในรูป log (x+1) ก่อนวิเคราะห์ข้อมูล

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2558
กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 3.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus* spp

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดิน อุปกรณ์สำหรับแยกไส้เดือนฝอยออกจากดินและส่วนของพืช อุปกรณ์สำหรับปลูกพืช กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงชนิดหัวกลับ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงและกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ คอมพิวเตอร์และอุปกรณ์ถ่ายภาพ เครื่องปั่นเหวี่ยง สไลด์ ถ้วยนับตัวอย่าง สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) สารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช สารกำจัดแมลง ปุ๋ยเคมี

- วิธีการ

การเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชชนิดที่มีรายงานการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดิน เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว ให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติก บันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก

การตรวจหา *Pasteuria* spp.

ตรวจหา *Pasteuria* spp. โดยตรวจหาจากไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มในตัวอย่างดิน ผสมตัวอย่างดินให้เข้ากัน แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดินหนัก 250 กรัม โดยวิธีการล้างตัวอย่างดิน และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่าง และนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจหาไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มที่มีสปอร์เกาะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย

กิจกรรมย่อยที่ 3.5 การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.5.1 การคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

- อุปกรณ์เก็บตัวอย่างได้แก่ พลั่วมือ ถุงพลาสติก มีดพร้า เสียม กรรไกรตัดแต่งกิ่ง
- วัสดุอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อ หม้อนึ่งความดัน ตู้อบฆ่าเชื้อ Haemacytometer
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง ขวดดูแรน บิกเกอร์ สไลด์และแผ่นแก้วปิดสไลด์ กระบอกตวง แท่งแก้ว ตะเกียงแอลกอฮอล์ หลอดแก้วมีฝาเกลียว
- เข็มเขี่ยปลายแหลม ห่วงถ่ายเชื้อ ปากคีบ ใบมีดผ่าตัด มีด
- ผ้าขาวบาง กระดาษซับนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (อาจใช้กระดาษทิชชูหรือกระดาษกรอง)
- แผ่นพลาสติกสำหรับรองตัดส่วนต่างๆของพืช
- กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ sterio

- อาหารแยกและเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA), Rose Bengal Agar (RBA), Corn Meal Agar (CMA) และ Malt Extract Agar (MEA)
- สารเคมีที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮเปอร์คลอไรต์ และ เอธิลแอลกอฮอล์ 75%
- วัสดุปลูก กระถางพลาสติก ถุงเพาะกล้า
- ต้นสมุนไพรที่ปกติไม่มีอาการของโรค
- ต้นกล้าพริก

วิธีการทดลอง

1. การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช (sample selection)

เก็บตัวอย่างต้นพืชสมุนไพรได้แก่ น้ำนมราชสีห์ ขิงป่า สาบเสือ โดยเก็บต้นปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรค ในเขต อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ห่อด้วยกระดาษ ใส่ถุงพลาสติก และบันทึกรายละเอียด ชนิดพืช แหล่งที่เก็บ วันที่เก็บ ผู้เก็บ

1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิวส่วนต่างๆ ของต้นสมุนไพรด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ เพื่อไม่ให้เชื้อราที่แยกได้เป็นเชื้อที่เจริญหรือติดบริเวณผิวของส่วนต่างๆเช่น ผิวใบ ซึ่งต้องทดสอบในพืชสมุนไพรทุกชนิดที่ทำการเก็บตัวอย่าง ก่อนนำมาแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อพืชเพื่อหาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ชิ้นส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นสมุนไพรในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆกัน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำตัวอย่างต้นสมุนไพรที่ไม่เป็นโรคมาล้างน้ำให้สะอาด
2. ตัดต้นสมุนไพรแต่ละส่วนที่จะทำการแยกให้ได้ความยาวประมาณ 1 ซม.
3. นำผ้าขาวบางมาห่อชิ้นส่วนของพืชที่ตัดได้ จากนั้นนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที
4. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมด แช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นต่างๆคือ 0, 1, 3 และ 5% ในเวลานานต่างๆกันคือ 1, 3 และ 5 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
5. นำผ้าขาวบางที่ห่อชิ้นส่วนของพืชทั้งหมดแช่ในแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 15 วินาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษซับที่ฆ่าเชื้อแล้ว
6. นำชิ้นส่วนของพืชวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ RBA (Rose Bengal Agar) โดยแต่ละจานอาหารวาง 5 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง
7. ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากแต่ละชิ้นส่วนของพืช วิเคราะห์ผลของการเจริญของเชื้อราที่เวลาและความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรท์ต่างๆกัน

1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ (isolation)

นำตัวอย่างพืชผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อที่ผิวตามข้อ 1.2 ตามความเข้มข้นที่ผ่านการทดสอบ ตรวจดูเชื้อราที่เจริญออกมาจากเนื้อเยื่อของแต่ละชิ้นพืช แยกเชื้อราที่ได้ไปทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร PDA และเก็บใน PDA slant เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ เพื่อจำแนกกลุ่มของเชื้อรา

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

2.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* อย่างน้อย 20 ไอโซเลท ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture โดยเริ่มวางเชื้อเพื่อทดสอบ ณ วันที่เชื้อมีอัตราการเจริญเท่ากัน วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำ 21 กรรมวิธี บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตบันทึกผลการเจริญของเชื้อราสาเหตุโดยวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุด้านที่ติดกับเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ในชุดทดสอบ และวัดขนาดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อราสาเหตุจากชุดควบคุม นำข้อมูลที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

สูตรคำนวณเปอร์เซ็นต์การยังยั้งการเจริญเติบโต (Percent Inhibition of Radial Growth: PIRG)

$$PIRG = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในจานชุดควบคุม

R2 = ความยาวรัศมีของโคโลนีของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ในจานชุดทดสอบ

โดยประมาณค่าการยับยั้ง (ประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์) ดังนี้ (เกษม, 2532)

>75%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
61 – 75 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
51 – 60 %	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
< 50%	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

2.2 การทดสอบในโรงเรือน

2.2.1 การศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการงอกของเมล็ดพริก

นำเมล็ดพริกขี้หนูที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ จำนวน 5 ไอโซเลท และในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผึ่งให้แห้งในสภาพอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเพาะในกระบะเพาะเมล็ดเป็นเวลา 20 วันบันทึกผลโดยหาเปอร์เซ็นต์ความงอก วัดความยาวของต้น ราก และน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 100 เมล็ด ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 01
กรรมวิธีที่ 2 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 02
กรรมวิธีที่ 3 เชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia 3
กรรมวิธีที่ 4 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 03
กรรมวิธีที่ 5 เชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 05
กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในโรงเรือน

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการแช่เมล็ด

นำเมล็ดพริกขี้หนูที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วมาแช่ในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์และน้ำกลั่นเป็นเวลา 15 นาที ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปเพาะในกระบะเพาะในวัสดุปลูกที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากเพาะกล้า 20 วัน จึงทำการย้ายปลูก หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ทำการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* (Shokes *et al*., 1996) ใช้ถุงพลาสติกคลุม 2 วัน เพื่อรักษาความชื้น ประเมินความรุนแรงของโรคโดยให้คะแนน 5 ระดับ ทุก 3, 5, 7, 11 และ 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 01
กรรมวิธีที่ 2 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 02
กรรมวิธีที่ 3 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia 3
กรรมวิธีที่ 4 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 03
กรรมวิธีที่ 5 แช่ด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 05
กรรมวิธีที่ 6 แช่ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

2.2.2.2 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการราดดิน

นำเมล็ดพริกขี้หนูที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วนำไปเพาะในกระบะเพาะในวัสดุปลูกที่ฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากเพาะกล้า 20 วัน จึงทำการย้ายปลูก หลังจากย้ายปลูก 15 วัน ทำการปลูกเชื้อ *S. rolfsii* (Shokes *et al*., 1996) จากนั้น 1 วัน ทำการราดดินด้วยบริเวณโคนต้นพริกด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเอนโดไฟท์ และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ใช้ถุงพลาสติกคลุม 2 วัน เพื่อรักษาวามชื้น ประเมินความรุนแรงของโรคโดยให้คะแนน 5 ระดับ ทุก 3, 5, 7, 11 และ 14 วัน วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ต้น ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 01
กรรมวิธีที่ 2 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 02
กรรมวิธีที่ 3 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ Mycelia sterilia 3
กรรมวิธีที่ 4 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 03
กรรมวิธีที่ 5 ราดด้วยเชื้อราเอนโดไฟท์ *Eupenicillium* spp. No. 05
กรรมวิธีที่ 6 ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (ชุดควบคุม)

การประเมินความรุนแรงของโรค

ใช้เกณฑ์การประเมินของ Shokes *et al.* (1996) โดยแบ่งความรุนแรงขงโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 1 ต้นปกติ
ระดับ 2 เกิดแผลที่โคนต้นอย่างเดียว
ระดับ 3 แสดงอาการเหี่ยว 25%
ระดับ 4 แสดงอาการเหี่ยว 26 – 50%
ระดับ 5 แสดงอาการเหี่ยวมากกว่า 50%

นำผลการประเมินที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย ตามสูตรดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ดัชนีการทำลาย} = \frac{\text{ผลรวมของการเป็นโรคแต่ละระดับ}}{\text{จำนวนต้นพืชที่สุ่ม}} \times \frac{100}{\text{ระดับสูงสุดของการเป็นโรค}}$$

ระยะเวลา

ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2556

สถานที่ดำเนินการ

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และห้องปฏิบัติการคลินิกพืช กลุ่มพัฒนาการตรวจสอบพืชและปัจจัยการผลิต สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

การทดลองที่ 3.5.2 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1.ตัวอย่างดินและพืช

2.ไส้เดือนฝอยรากปม(*Meloidogyne* spp.)

3. .สารเคมี และวัสดุเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น PDA WA streptomycin

4. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound และ แบบ stereo

5.อุปกรณ์พื้นฐานของห้องปฏิบัติการ เช่น หม้อนึ่งความดัน ตู้อบเครื่องแก้ว ตู้เย็น ไมโครเวฟ แก๊สหุงต้ม เข็มเขี่ย สไลด์ จานเลี้ยงเชื้อ หลอดแก้ว ที่วางหลอด parafilm สำลี ถุงมือยาง กล่องชื้น(moist chamber) ตะเกียง และแอลกอฮอล์ เป็นต้น

6.อุปกรณ์และสารเคมี ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย เช่น ตะแกรง กรวย (วิธีการแยกเชื้อ) โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl)

วิธีการ

- **วิธีปฏิบัติการทดลอง**

1.การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ๆมีการระบาดของไส้เดือนฝอยรากปมจำนวนตัวอย่ขึ้นอยู่กับขนาดพื้นที่ เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรครากปมและดินบริเวณรอบๆรากพืช โดยใช้พลั่วขุดดินบริเวณผิวหน้าดิน ลึกประมาณ 10 ซม. แยกตัวอย่างดินและตัวอย่างพืช ใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลของแหล่งที่เก็บดิน เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการทำการแยกเชื้อ

2. การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม แบ่งการแยกเชื้อราเป็น 4 ส่วนคือ แยกเชื้อราจาก กลุ่มไข่ (egg mass) ไข่ (eggs) ตัวเต็มวัยเพศเมีย และ ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ดังนี้

- การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

จากตัวอย่างพืชรากปมใช้เข็มเขี่ยกลุ่มไข่นำมาฆ่าเชื้อใน 1 % โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl)นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบน 0.8% WA (water agar) ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

-การแยกเชื้อราจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากปมของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลาย มาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนปม แช่ในน้ำยา 2% โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) ในขวดแล้วเขย่า เพื่อละลายเมือกหุ้มถุงไข่ จะได้ไข่แยกเป็นฟองเดี่ยวๆล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนตะแกรง 400 mesh เก็บ suspension หลังจากนั้น ดูด suspension 1 มิลลิลิตร ไปทำ spread plate บน 0.8% WA (water agar) ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

-การแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม

จากตัวอย่างพืชรากปมใช้เข็มเขี่ยตัวเต็มวัยเพศเมีย นำมาฆ่าเชื้อใน 2 % โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์ (NaOCl) นาน 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบน 0.8% WA ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร

-การแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม

นำรากปมของพืชที่ถูกไส้เดือนฝอยทำลาย มาทำความสะอาด ตัดเอาเฉพาะส่วนปม แช่ในน้ำยา 2%โซเดียม ไฮโปรคลอไรท์(NaOCl) ในขวดแล้วเขย่า เพื่อละลายเมือกหุ้มถุงไข่ จะได้ไข่แยกเป็นฟอง เดี่ยวๆล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ บนตะแกรง 500 mesh เก็บ suspension นำไปใส่ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน ให้ไส้เดือนฝอยออกจากไข่ เพื่อเตรียมใช้เป็นเหยื่อล่อ จากตัวอย่างดิน นำดินตัวอย่างละ 1 กรัม โปรยบน0.8% WA ที่มี streptomycin 0.2 กรัมต่อสิตร จากนั้นใส่ตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม ประมาณ 100-200 ตัวต่อ มิลลิลิตร

ทุกวิธีการเมื่อทำเสร็จแล้ว ทำการบ่มเชื้อ 3-7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) และตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา เมื่อพบจึงใช้เข็มเขี่ยทำสไลด์เพื่อศึกษารายละเอียด บันทึกภาพ บันทึกประวัติ และ เมื่อเชื้อราเจริญขึ้นมา ใช้เข็มเขี่ย hyphal tip ของเชื้อราแต่ละโคโลนีลงใน slant PDA (Potato Dextrose Agar) แต่ละ isolate นับเป็น 1 isolate

3.การทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมในกระถางทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 8 กรรมวิธี

กรรมวิธี 1. *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธี 2. *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธี 3. *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1

กรรมวิธี 4. *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธี 5. *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธี 6. *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2

กรรมวิธี 7. ควบคุม ไส้เดือนฝอยไม่ใส่เชื้อรา

กรรมวิธี 8. ควบคุม ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย และไม่ใส่เชื้อรา (ปกติ)

หมายเหตุ ;กรรมวิธีที่ 8 ไม่นำมาร่วมวิเคราะห์สถิติ

3.1 เก็บตัวอย่างดินจากแหล่งการระบาดของโรครากปม โดยประยุกต์วิธีเก็บตัวอย่างของ Souza *et.al.* (2007) โดยเก็บตัวอย่างดินซึ่งมีความลึกอยู่ในช่วงประมาณ 0-25 เซนติเมตร นำดินจาก 10 จุดที่เก็บมาคลุกเคล้ารวมกันโดยมีน้ำหนักโดยประมาณ 500 กรัม นำใส่ถุงพลาสติก รัดปากถุงให้แน่นใส่ในลังน้ำแข็งนำกลับมาตรวจที่ห้องปฏิบัติการ

3.2 การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่าง

หลังจากได้ตัวอย่างดินแล้วทำการแยกไส้เดือนฝอยโดยการใช้ตะแกรงและกรวย (Cobb sieving & Baerman funnel method) ตรวจตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

3.3. เลี้ยงไส้เดือนฝอยเพื่อเพิ่มปริมาณ

จากข้อ 2 เมื่อตรวจตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำแล้วพบว่าเป็นไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp.จึงนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวน ดังนี้

- ใช้เข็มหรือไม้ไผ่เหลาปลายเขี่ยไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp.ที่พบแต่ละตัวลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร

-การเตรียมพืชเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพื่อเพิ่มปริมาณโดยปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาจำนวน

20 ต้นในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อ 0.8 ลิตร กระถางละ 1 ต้น

- การปลูกเชื้อ ทำหลังจากปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ 15 วัน โดยนำไส้เดือนฝอย *Meloidogyne* sp. จากข้อ 3.1 จำนวน 100 ตัวในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อราดลงบนดินปลูกในกระถางมะเขือเทศที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2 หลังจากทำการปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 35 วัน จึงสามารถนำมาเตรียมเป็น inoculum ของไส้เดือนฝอยที่จะใช้ในการปลูกเชื้อในพืชทดสอบได้

3.4. การเตรียมพืชทดสอบ โดยปลูกต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร บรรจุดินนึ่งฆ่าเชื้อ 0.8 ลิตร กระถางละ 1 ต้น

3.5. การปลูกเชื้อ ทำหลังจากปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาได้ 15 วัน มีขั้นตอนดังนี้

- เตรียม inoculum ของไส้เดือนฝอย ดังนี้เขี่ยกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอย โดยนำกระถางมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 ทำการคว่ำกระถางเพื่อนำต้นมะเขือเทศออกจากกระถางเคาะดินออกอย่างเบามือแล้วล้างรากมะเขือเทศให้สะอาด จากนั้นใช้คีมปากคีบขนาดเล็กคีบกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอย (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ)วางบนภาชนะสำหรับฟักไข่ไส้เดือนฝอยซึ่งมีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มฟักไข่ไส้เดือนฝอย ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

-การปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยลงในดินปลูกของกระถางมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่ได้ เตรียมไว้ในแล้วดังนี้ เมื่อไส้เดือนฝอยฟักจากไข่เป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 นำมานับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ แล้วปรับปริมาตรให้มีตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอย ปริมาณประมาณ 1500 ตัวต่อน้ำ 50 มิลลิลิตร ต่อกระถางมะเขือเทศ 1 กระถาง ซึ่งเป็นจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (initial population ; *Pi*)

-เตรียม inoculum ของเชื้อรา ดังนี้นำเชื้อราแต่ละไอโซเลท เพาะเลี้ยงบน PDA เป็นเวลา 7 วัน แล้วทำ suspension โดยล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และการปลูกเชื้อรา นำ suspension จำนวน 25 มิลลิลิตรราดลงบนดินปลูกในกระถางที่ได้ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอยเป็นเวลา 7 วัน

3.6.ทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมตามกรรมวิธีตามแบบและวิธีการทดลอง

3.7.ตรวจผลการทดลอง โดยทำหลังจากทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมแล้วเป็นเวลา 45 วัน ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 1) การนับจำนวนไส้เดือนฝอย ที่พบในดินปลูกและรากมะเขือเทศ 2) อัตราการขยายพันธุ์ (Reproductive factor value ; *Rf*) 3) การวัดดัชนีการเกิดรากปม

-การนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบในดินปลูกและมะเขือเทศ โดยแยกไส้เดือนฝอยจากดินโดยนำดิน 500 กรัมจากกระถางทดลอง มาแยกไส้เดือนฝอยโดยการใช้ตะแกรงและกรวย (Cobb sieving & Baerman funnel method) ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ

-แยกไส้เดือนฝอยจากมะเขือเทศ โดย นำรากมะเขือเทศ ทั้งหมดมา แยกไส้เดือนฝอยด้วยโดยวิธี Blender centrifugal flotation แล้วตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำจำนวนไส้เดือนฝอยที่ได้จากดินปลูกและ รากมะเขือเทศรวมกันเป็นจำนวนไส้เดือนฝอยสิ้นสุด (final population ; *Pf*)

-การวัดดัชนีการเกิดรากปม

ถอนต้นมะเขือเทศ พร้อมรากเพื่อประเมินการเกิดปมโดยประยุกต์ใช้เกณฑ์ประเมินระดับการเกิดโรคตาม Taylor and Sasser (1978) และ Hussey and Boerma, (1981) ดังนี้

0= รากไม่ปรากฏอาการปม

1= รากปรากฏอาการปม 1-10 % ของระบบร

2= รากปรากฏอาการปม 11-25 % ของระบบราก
3= รากปรากฏอาการปม 26-50 % ของระบบราก
4=รากปรากฏอาการปม 51-75 % ของระบบราก
5=รากปรากฏอาการปมมากกว่า 75 % ของระบบราก

ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้นปีงบประมาณ 2554 สิ้นสุด 2557 รวม 4 ปี
เริ่มทดลอง ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2557

สถานที่ดำเนินการ

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงเกษตรกร ในพื้นที่การระบาดของโรค จ.นครปฐม ราชบุรี สมุทรสาคร ตาก อุบลราชธานี

การทดลองที่ 3.5.3 การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคพืช (non-pathogenic *Fusarium*) ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

วิธีดำเนินการทดลอง

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตัวอย่างดินจากแหล่งปลูกพืชต่างๆ ในประเทศไทย
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ WA (Water Agar), PDA (Potato Dextrose Agar), CLA (Corn Leaf Agar) และ KCL
3. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
4. อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ
5. วัสดุอุปกรณ์สำหรับปลูกต้นไม้ในโรงเรือนทดลอง เช่น กระถางปลูกต้นไม้ขนาดความจุ 10 ลิตร ดิน พลั่ว บัวรดน้ำ ฯลฯ
6. เมล็ดพันธุ์ หรือต้นกล้าพืช สำหรับทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค
7. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ย จานแก้วเลี้ยงเชื้อ แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นแก้วปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
8. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA), Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Corn Leaf Ager (CLA)
9. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope) กล้อง Stereoscopic microscope และกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์
10. เอกสารและตำราเกี่ยวกับชนิดและภาพ (monograph) ของเชื้อรา
11. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

<u>วิธีการ</u>

<u>1</u><u>. การเก็บรวบรวมเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*)</u> มีวิธีการดังนี้

ทำการเก็บรวบรวมดินบริเวณรากของพืชที่มีลักษณะการเจริญสมบูรณ์ ไม่แสดงอาการเหี่ยว หรือต้นเน่า หรือเก็บรวบรวมดินในป่า บันทึกข้อมูลสภาพดิน และความเป็นกรด-ด่างของดิน

2. การแยกเชื้อ *F. oxysporum* จากดิน

ทำการแยกเชื้อรา *F. oxysporum* จากดินด้วยวิธี soil dilution plate technique โดยชั่งดิน 10 กรัม มาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร เขย่าดินให้ละลาย แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} หยดสปอร์แขวนลอยความแต่ละความเข้มข้น จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงเกลี่ยบนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นตรวจสอบเบื้องต้น เมื่อพบว่าได้เป็นเชื้อรา *F. oxysporum* จึงย้ายเส้นใยเชื้อลงบนอาหาร PDA ต่อไป

3. การศึกษาและการจำแนกชนิด

3.1 ทำเชื้อบริสุทธิ์โดยการใช้ single–spore technique

เขี่ยกลุ่มสปอร์ลงใน vial ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำสปอร์แขวนลอยให้มีปริมาณสปอร์ประมาณ 10 สปอร์ ต่อ 1 loop ภายใต้ objective กำลังขยายต่ำ ใช้ห่วงลวด (loop) ที่ปลอดเชื้อจุ่มลงในสปอร์แขวนลอย แล้วลาก (streak) ลงบนผิวหน้าของอาหาร WA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง ตักสปอร์เดี่ยวที่งอก มาเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสม

3.2 การจำแนกชนิด

ทำการศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยา ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

- ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา ศึกษาการสร้าง pigment, sclerotium และ sporodochium ในอาหาร PDA
- ลักษณะและขนาดของ conidium, conidiophore บนอาหาร CLA อายุ 10-14 วัน ที่อุณหภูมิ 26-28 °ซ. ภายใต้แสง NUV
- ทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะของ sporogenous cell, phialide, microconidium, macroconidium

4. ตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และผลกระทบของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้ต่อต้นมะเขือเทศ ตามวิธีการของ Da Silva และคณะ (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato โดยนำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน มาล้างราก แล้วจุ่มรากลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำต้นกล้าไปปลูกในกระถางดินร่วน ขนาด 500 มิลลิลิตร เปรียบเทียบผลกับกรรมวิธีการไม่จุ่มรากมะเขือเทศในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา และ กรรมวิธีการจุ่มรากมะเขือเทศในอาหาร PDB (potato dextrose broth) ดูแล การเจริญเติบโตของมะเขือเทศในโรงเรือน และตรวจสอบการเกิดโรค และความสูงของต้นมะเขือเทศหลังย้ายลงปลูกในกระถางดิน 35 วัน

เมื่อพบว่า เชื้อรา *F. oxysporum* ไม่ทำให้เกิดโรคกับมะเขือเทศที่นำมาทดสอบ จึงเก็บเชื้อเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ห้องปฏิบัติการ มีวิธีการดังนี้

1. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA

2. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค บนอาหาร PDA

3. ทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 ^{O}ซ

4. บันทึกผล วัดขนาดของพื้นที่การยับยั้งการเจริญ วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค

5. การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในโรงเรือน ตามวิธีการของ Da Silva *et al.* (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato มีวิธีการดังนี้

1. เพาะเมล็ดมะเขือเทศ ลงในกระถางเพาะต้นกล้า ดูแล การเจริญเติบโตของต้นกล้ามะเขือเทศ จนมีอายุ 30 วัน

2. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* บนอาหารวุ้น PDA โดยตัดชิ้นวุ้นอาหาร PDA ขนาด 1x1 เซนติเมตร ที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* เจริญอยู่ ลงบนอาหารวุ้น PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำสปอร์แขวนลอย ที่ความหนาแน่น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร คลุกเคล้ากับดินปลูกพืช พักดินให้เชื้อราเจริญและปรับตัวเป็นเวลา 10 วัน

3. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค บนอาหารวุ้น PDA (ตามวิธีการในข้อ 1) แล้วเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความหนาแน่น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

4. นำต้นกล้ามะเขือเทศอายุ 30 วัน มาล้างราก แล้วแช่รากในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาปลูกในกระถางดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ดูแล การเจริญเติบโตของมะเขือเทศในโรงเรือน และตรวจสอบการเกิดโรค และความสูงของต้นมะเขือเทศหลังย้ายลงปลูกในกระถางดิน 35 วัน ดำเนินการทดลองตามกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. กรรมวิธีทดลอง : ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + แช่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)

2. กรรมวิธีเปรียบเทียบ : ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่แช่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)

3. กรรมวิธีเปรียบเทียบ 1 : ต้นมะเขือเทศ + ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่แช่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy) ไม่

4. กรรมวิธีเปรียบเทียบ 2 : ต้นมะเขือเทศ + ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่แช่รากในเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy) แต่แช่รากในอาหาร PDB (potato dextrose broth)

ดำเนินการทดลองกับเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค 7 ไอโซเลท แต่ละกรรมวิธีมีต้นมะเขือเทศทดสอบจำนวน 20 ต้น (กระถาง) ดำเนินแผนการทดลอง แบบ RCBD

5. ตรวจสอบ และบันทึกผลระดับการเกิดโรคในพืชที่ทดสอบ

การบันทึกผลระดับการเกิดโรคบนมะเขือเทศ ใช้วิธีการตามทดลองของ Da Silva *et al.* (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato ดังนี้

1 = ต้นพืชปกติ ไม่แสดงอาการ

2 = บริเวณข้อแรกจากรากของต้นพืชมีอาการท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

3 = ท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลุกลามขึ้นสูงถึงระดับใบแรก ใบพืชเหลืองอย่างน้อย 1 ใบ

4 = ท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลุกลามถึงครึ่งของความสูงลำต้นพืช ใบพืชเหลือง 2 หรือมากกว่า 2 ใบ

5 = ท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลุกลามเกือบถึงยอด ใบเกือบทั้งหมดมีอาการเหี่ยว ยกเว้นยอดของพืช

6 = พืชตาย หรือพืชแสดงอาการท่อลำเลียงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล และเหี่ยว จนลุกลามถึงยอดพืช

6. นำผลที่ได้มาวิเคราะห์และเปรียบเทียบกับกรรมวิธีการไม่แช่รากมะเขือเทศในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา และ กรรมวิธีการแช่รากมะเขือเทศในอาหาร PDB (potato dextrose broth)

เวลาและสถานที่

เวลา : เริ่มต้น ตุลาคม 2554 สิ้นสุด กันยายน 2557

สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกพืชของเกษตรกร

การทดลองที่ 3.5.4 การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma harzianum*ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง เช่น กรรไกร ถุงพลาสติก ฯ
2. จานเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ
3. เครื่องชั่ง กระบอกตวง
4. กล้องถ่ายรูป
5. กล้องจุลทรรศน์
6. ป้ายปักแปลง ปากกาเขียนป้าย
7. เมล็ดพันธุ์คะน้า
8. ถังพ่นยา

วิธีการ

1. เก็บรวบรวมเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไอโซเลทต่างๆจากแปลงปลูกพืชและฟาร์มเห็ดของเกษตรกร โดยเก็บจากวัสดุปลูก ดินปลูก นำมาทำการศึกษาจำแนกชนิดเชื้อรา เก็บรักษาเชื้อราดังกล่าวในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ในการศึกษาการควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* สาเหตุโรคใบจุดคะน้าในปีต่อไป

2. การทดลองในเรือนทดลอง

2.1. ปลูกคะน้าในกระถางๆ ละ 1 ต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 7 กรรมวิธี โดยใช้ต้นคะน้า 1 ต้นต่อ 1 ซ้ำ ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินต้นเมลอน

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินแปลงพริก

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* เชื้อจากเกษตรกรจ.อุบลราชธานี

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทจากก้อนเห็ดภูฏาน

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินถุงปลูกอ้อย

กรรมวิธีที่ 6 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินปลูกมะละกอ แปลงพืชสวนศรีสะเกษ

กรรมวิธีที่ 7 พ่นน้ำเปล่า

2.2. พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. brassicicola* ลงบนกล้าคะน้าที่อายุ 45 วัน ใช้ถุงพลาสติกคลุมให้ความชื้น 48 ชั่วโมง

2.3. พ่นสปอร์และเส้นใยแขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* แต่ละไอโซเลท ที่มีปริมาณเชื้อรา 10^9 cfu/ml. ลงบนกล้าคะน้าทดสอบตามกรรมวิธีที่กำหนดในแผนการทดลองโดยพ่น 3 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน พ่นครั้งแรกเมื่อพบคะน้าแสดงอาการโรคใบจุด

2.4. วัดผลโดยประเมินการเป็นโรค แบ่งระดับความรุนแรงเป็น 6 ระดับ

ระดับที่ 1 ใบไม่ปรากฏอาการโรค

ระดับที่ 2 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 1-5 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 3 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 6-10 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 4 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 11-25 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 5 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 26-50 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 6 ใบปรากฏอาการโรคมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ใบ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกการเกิดโรคใบจุดคะน้า ตามระดับความรุนแรงดังกล่าวข้างต้น ก่อนพ่นเชื้อรา *T. harzianum* ทุกครั้ง และหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 และ 14 วัน

3. การทดลองในแปลงทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ได้แก่

กรรมวิธีที่ 1 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินต้นเมลอน

กรรมวิธีที่ 2 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินแปลงพริก

กรรมวิธีที่ 3 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* เชื้อจากเกษตรกรจ.อุบลราชธานี

กรรมวิธีที่ 4 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินถุงปลูกอ้อย

กรรมวิธีที่ 5 พ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ไอโซเลทดินปลูกมะละกอ แปลงพืชสวนศรีสะเกษ

กรรมวิธีที่ 6 พ่นน้ำเปล่า

โดยตัดกรรมวิธีไอโซเลทจากก้อนเห็ดภูฏานออก เนื่องจากเชื้อมีการปนเปื้อน ทำการปลูกคะน้าในแปลงทดลองขนาด 10 ตารางเมตรต่อแปลงย่อย พ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. brassicicola* เมื่อพืชอายุ 30 วัน ทำการพ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* แต่ละกรรมวิธี จำนวน 4 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน พ่นครั้งแรกเมื่อเริ่มพบอาการโรคใบจุด วัดผลการเกิดโรคก่อนพ่นเซลล์แขวนลอย *T. harzianum* ทุกครั้ง และหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน

วัดผลโดยประเมินการเป็นโรค แบ่งระดับความรุนแรงเป็น 6 ระดับ

ระดับที่ 1 ใบไม่ปรากฏอาการโรค

ระดับที่ 2 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 1-5 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 3 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 6-10 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 4 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 11-25 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 5 ใบปรากฏอาการโรคร้อยละ 26-50 ของพื้นที่ใบ

ระดับที่ 6 ใบปรากฏอาการโรคมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่ใบ

เก็บข้อมูลการเกิดโรคใบจุดคะน้า 20 ต้นต่อแปลงย่อย นำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ผลทางสถิติ ตามแผนการทดลอง

เวลาและสถานที่

ดำเนินการระหว่าง ตุลาคม 2555 – กันยายน 2558 ที่ห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และแปลงปลูกคะน้า จ.ลำพูน

การทดลองที่ 3.5.5 การคัดเลือกเชื้อรา *Oudemansiella* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสกุล *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ในพริก

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

1. เห็ดในสกุล *Oudermansiella* spp. ที่เก็บอยู่ในหน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร
2. เชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืช
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) และ potato dextrose broth (PDB)
4. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการและเครื่องแก้ว
5. อุปกรณ์บันทึกผลการทดลองได้แก่ กล้องถ่ายภาพ และสมุดบันทึก

- วิธีการ

1. เลี้ยงและขยายปริมาณเห็ด *Oudemansiella* spp.

เลี้ยงเห็ดในสกุล *Oudermansiella* spp. ซึ่งเก็บรักษาอยู่ขวดในน้ำกลั่นนึ่งปลอดเชื้อ ของหน่วยเก็บรักษาศูนย์เชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร จำนวน 4 ไอโซเลท คือ

(1) ไอโซเลท L3P พบที่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.พิกุลทอง จ.นราธิวาส เมื่อ พ.ศ. 2539

(2) ไอโซเลท ชช 17 พบที่ จ.ตาก โดยศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และยงยุทธ สายฟ้า เมื่อ พ.ศ. 2544

(3) ไอโซเลท หนาว พบที่ อ.ภูเรือ จ.เลย เมื่อ พ.ศ. 2545

(4) ไอโซเลท สุราษฎร์ พบที่ อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี เมื่อ พ.ศ. 2552

บนอาหาร PDA เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จนเห็นเส้นใยเจริญ ใช้ cork borer เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ใส่ลงในขวดบรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วางขวดอาหารเหลว PDB บนเครื่องเขย่าขวดอาหารและตั้งให้เครื่องเขย่ามีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 และ 60 วัน จนเห็นการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ดเป็นก้อนกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0-5.0 มิลลิเมตร

2. ศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับอบแห้งเส้นใยเห็ด

นำกลุ่มเส้นใยเห็ดสกุล *Oudermansiella* spp. ทั้ง 4 ไอโซเลท อายุ 1 และ 2 เดือนซึ่งเจริญอยู่ในอาหารเหลว PDB มากรองด้วยกระดาษกรอง Wathman เบอร์ 1 บนกรวยแก้ว ย้ายเส้นใยที่กรองได้ไปวางบนกระดาษฟรอยด์ ก่อนนำไปอบที่ตู้อบความร้อน อุณหภูมิ 30, 45 และ 50 องศาเซลเซียส บันทึกเวลาที่ใช้อบจนเส้นใยเห็ดสกุล *Oudermansiella* spp. แห้ง ณ อุณหภูมิต่างกัน

3. เลี้ยงและขยายปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคพืช

เก็บรวบรวมตัวอย่างพริกเป็นโรคแอนแทรคโนสซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Colletotrichum* spp. จากแปลงเกษตร จำนวน 1 ไอโซเลท แยกและเลี้ยงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน จนเห็นเส้นใยเจริญเพื่อรอทดสอบ

เลี้ยงและขยายเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชซึ่งเก็บรักษาอยู่ใน culture collection จำนวน 3 ไอโซเลทคือ

(1) *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบที่ จ.อุบลราชธานี

(2) *C. gloeosposiodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก พบที่ จ.พิจิตร

(3) *C. gloeosposiodes* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง พบที่ จ.สุพรรณบุรี

บนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันจนเห็นเส้นใยเจริญเพื่อรอทดสอบ

4. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่บริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหาร PDA ในจานอาหาร อีกด้านหนึ่งวางชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชที่ถูกเจาะด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร วางอยู่ให้มีระยะห่างกัน 3 เซนติเมตร ชุดควบคุม (control) วางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDA วางจานอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารชุดควบคุมเจริญเต็มจาน จดบันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชของเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ

- เวลาและสถานที่ เริ่มต้น ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กันยายน 2556
ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช และ
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์สำนักวิจัยและพัฒนา
เทคโนโลยีชีวภาพ

การทดลองที่ 3.5.6 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจาก*Oudermansiella*spp. ต่อการเจริญของรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

(1) เห็ด *Oudermansiella* spp. 4 ไอโซเลท

(2) ตัวอย่างพืชเป็นโรคที่เกิดจากรา *Alternariabrassicae, A. brassicicola, A. porri*และ *A. solani*จากแปลงเกษตรกร

(3) อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDB

(4) อุปกรณ์ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ และกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสงแบบ compound และ stereo

(5) อุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการระเหิดแห้ง ฯลฯ และตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ อะซีโตน เมธานอล เอธิลแอลกอฮอล และ เอธิลอะซิเตท

(6) อุปกรณ์เครื่องแก้ว และกระดาษกรอง Wathmanเบอร์ 1

(7) อุปกรณ์บันทึกผลการทดลอง ได้แก่ กล้องถ่ายภาพ และสมุดบันทึก

- วิธีการ

(1)เลี้ยงและขยายปริมาณเห็ด *Oudemansiella* spp.

เลี้ยงเห็ดในสกุล *Oudermansiella* spp. ซึ่งเก็บรักษาอยู่ขวดในน้ำกลั่นนึ่งปลอดเชื้อ ของหน่วยเก็บรักษาศูนย์เชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร จำนวน 4 ไอโซเลท คือ

- ไอโซเลท L3P พบที่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทองอันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.พิกุลทอง จ.นราธิวาส เมื่อ พ.ศ. 2539
- ไอโซเลท ชช 17 พบที่ จ.ตาก โดยศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และยงยุทธ สายฟ้า เมื่อ พ.ศ. 2544
- ไอโซเลท หนาว พบที่ อ.ภูเรือ จ.เลย เมื่อ พ.ศ. 2545
- ไอโซเลท สุราษฎร์ พบที่ อ.กาญจนดิษฐ์ จ.สุราษฎร์ธานี เมื่อ พ.ศ. 2552

บนอาหาร PDA เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จนเห็นเส้นใยเจริญ ใช้ cork borer เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเห็ดเจริญอยู่ใส่ลงในขวดบรรจุอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร วางขวดอาหารเหลว PDB บนเครื่องเขย่าขวดอาหารและตั้งให้เครื่องเขย่ามีความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 30 และ 60 วันจนเห็นการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ดเป็นก้อนกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0-5.0 มิลลิเมตร นำมาสกัดด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือ อะซีโตน เมธานอล เอธิลแอลกอฮอล และ เอธิลอะซิเตท จนได้เป็นสารสกัดหยาบ นำมาเติมด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เพื่อละลายก่อนนำไปทดลอง

(2)เลี้ยงและขยายปริมาณเชื้อราสาเหตุโรค

เก็บรวบรวมตัวอย่างพืชเป็นโรคซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria*spp. จากแปลงเกษตร จำนวน 1 ไอโซเลท แยกและเลี้ยงบนอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วันจนเห็นเส้นใยเจริญเพื่อรอทดสอบ

(3)ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร เจาะอาหาร PDA ที่มีเส้นใยเชื้อรา *Alternaria*spp. สาเหตุโรคพืชเจริญอยู่บริเวณขอบโคโลนีวางบนอาหาร PDA ในจานอาหาร อีกด้านหนึ่งวางกระดาษกรอง Wathmanเบอร์ 1 อบฆ่าเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.0 มิลลิเมตร หยดด้วยสาร *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ชุดควบคุม (control) วางชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราสาเหตุโรคบนอาหาร PDAและหยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อบนกระดาษกรอง วางจานอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรคในจานอาหารชุดควบคุมเจริญเต็มจาน จดบันทึกลักษณะการยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Alternaria*spp. สาเหตุโรคพืชที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลทต่างๆ

- เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2557

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช และห้องปฏิบัติการกลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 3.5.7 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก

วิธีดำเนินการทดลอง

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการโรคพืช เช่น ตู้เขี่ยเชื้อ เข็มเขี่ย จานแก้วเลี้ยงเชื้อ แผ่นแก้วสไลด์พร้อมแผ่นแก้วปิดสไลด์ และตะเกียงแอลกอฮอล์
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA), Water Agar (WA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ Corn Leaf Ager (CLA)
3. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (Compound microscope) กล้อง Stereoscopic microscope และกล้องถ่ายภาพพร้อมอุปกรณ์
4. เอกสารและตำราเกี่ยวกับชนิดและภาพ (monograph) ของเชื้อรา
5. กล้องถ่ายภาพ กล้องจุลทรรศน์พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
6. เชื้อราปฏิปักษ์ *T. harzianum* จำนวน 5 สายพันธุ์ (Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5)
7. เชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* สาเหตุโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้า

วิธีการทดลอง

1. เตรียมเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2. เตรียมเชื้อรา *T. harzianum* ไอโซเลทต่าง ๆ ที่มีจำหน่ายเป็นการค้าและมีการศึกษามาก่อน จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ซึ่งสามารถควบคุมการเกิดโรคที่เกิดจากเชื้อราโรคพืชได้ บนอาหาร PDA

3. จุ่มรากต้นกล้ากล้วยน้ำว้าอายุ 3 เดือนลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาวางพักในที่ร่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4. ทดสอบวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมการเกิดโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้า ดำเนินการ 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 : วางแผนการทดลอง ดังนี้

- ทำการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design)

มีกรรมวิธีการทดลอง 6 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7สปอร์ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

วิธีการทดลอง ดังนี้

- นำต้นกล้ากล้วยน้ำว้าที่ปลูกเชื้อแล้ว จุ่มลงในสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำลงปลูกในแปลงที่มีสภาพดินร่วนสวน ดูแลให้น้ำ และปุ๋ย ตรวจสอบการเกิดโรคทุก ๆ เดือน หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 2 เดือน จนต้นกล้วยอายุได้ 9 เดือนโดยเปรียบเทียบกรรมวิธีการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ

วิธีที่ 2 : วางแผนการทดลอง ดังนี้

- ทำการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design)

มีกรรมวิธีการทดลอง 6 กรรมวิธี ดังนี้ กรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น

- วิธีการทดลอง ดังนี้

นำต้นกล้ากล้วยน้ำว้าที่ปลูกเชื้อแล้ว ลงปลูกในแปลงที่มีสภาพดินร่วนสวน ซึ่งพื้นหลุมที่ปลูกต้นกล้วย จะรองด้วยเชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือก อายุ 7 วัน ดูแลให้น้ำ และปุ๋ย ตรวจสอบการเกิดโรคทุก ๆ เดือน หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 2 เดือน จนต้นกล้วยอายุได้ 9 เดือนโดยเปรียบเทียบกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม กับกรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ

5. ตรวจสอบผลการทดลอง

ตรวจสอบและบันทึกลักษณะอาการภายนอกที่เกิดกับใบและลำต้นเทียม หลังการปลูกเชื้อ 2 ถึง 9 เดือน และอาการภายในที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนหรือระยะที่ต้นกล้วยแตกปลี บันทึกระดับความรุนแรงของโรคโดยอาศัยระดับการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลของเนื้อเยื่อภายในเหง้า 8 ระดับ ตามวิธีการของ Moore *et al.* (1993) ดังนี้

ระดับที่ 1 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าหรือรอบๆ ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

ระดับที่ 2 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าไม่แสดงอาการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล
แต่เปลี่ยนสีที่บริเวณเนื้อเยื่อเชื่อมต่อกันของรากและเหง้า
ระดับที่ 3 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีเล็กน้อย จนถึง 5 % ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า
ระดับที่ 4 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 6 – 20 % ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า
ระดับที่ 5 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสี 21 – 50 % ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า
ระดับที่ 6 : เนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนสีมากกว่า 50 % ของพื้นที่ทั้งหมดภายในเหง้า
ระดับที่ 7 : เนื้อเยื่อส่วนภายในเหง้าทั้งหมดเปลี่ยนสี (100 %)
ระดับที่ 8 : ต้นพืชตาย

นำผลการตรวจสอบที่ได้มาวิเคราะห์ผล และเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธี และในเชื้อรา *T. harzianum* แต่ละไอโซเลท ด้วยวิธีการทางสถิติ

<u>เวลาและสถานที่</u>

เวลา : เริ่มต้น ตุลาคม 2555 สิ้นสุด กันยายน 2557
สถานที่ : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Result and Discussion)

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.1.1การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

ผลการทดลอง

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 สำหรับควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง

1.1 การเตรียมผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4

ทำการเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 บนอาหารแข็ง TSA ผสม magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1M carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5% และสารพาผงแป้งทัลคัม (Talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ผึ่งให้แห้งสนิทในตู้ปลอดเชื้อ นำไปตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่ผลิตได้ โดยนำส่วนผสมผงสำเร็จแบคทีเรีย 1 กรัม มาตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ด้วยวิธี dilution plating บนอาหาร NA พบว่าปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในผงสำเร็จแบคทีเรียที่เตรียมจากอาหารแข็ง TSA คือ $4.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม

1.2 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ

นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่ผลิตได้ แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่มีชีวิตรอดในผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณแบคทีเรียเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 3 โดยลดลงจาก $2.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม เหลือ $3.5x10^{9}$ หน่วยโคโลนี/กรัม และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เดือนที่ 8 จนถึงเดือนที่ 12 จาก $2.6x10^{8}$ หน่วยโคโลนี/กรัม เหลือเพียง $1.1x10^{2}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่เก็บไว้ในตู้เย็นยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 15 เดือน โดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย จากปริมาณเริ่มต้น $4.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ลดลงเหลือ $7.8x10^{7}$ หน่วยโคโลนี/กรัม ในเดือนที่ 15 (Table 1)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง

นำผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนปลูกพืชทดลอง โดยปริมาณประชากรของแบคทีเรีย *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ $4.6x10^{6}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม พบว่าประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกมันฝรั่ง ควบคุมโรคได้ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณของแบคทีเรีย *B. subtilis* $3.5x10^{5}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม และมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง $5.6x10^{3}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแสดงอาการของโรคเหี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณของแบคทีเรีย *R. solanacearum* $7.7x10^{5}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (Table 2)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาอัตราที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยปลูกมันฝรั่งตามกรรมวิธีที่วางแผนการทดลองไว้ และตรวจสอบจำนวนต้นมันฝรั่งที่เป็นโรคเหี่ยวทุก 30 วัน พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งได้ดีที่สุด มันฝรั่งเป็นโรคเหี่ยว 16.9 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 และ 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน และกรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้นทุก 7 วัน ที่เป็นโรคเหี่ยว 26.3, 44.1 และ 47.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคเหี่ยวแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง ซึ่งเป็นโรคเหี่ยว 75.9 เปอร์เซ็นต์ (Table 3)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.4x10^2$, $4.2x10^3$ และ $7.3x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $3.2x10^2$, $5.3x10^3$ และ $3.7x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $4.6x10^3$, $5.4x10^5$ และ $8.4x10^5$ ตามลำดับ และกรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้น มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.2x10^2$, $4.2x10^3$ และ $6.6x10^3$ ตามลำดับ (Table 4)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.9x10^5$, $4.3x10^3$ และ $2.1x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 40 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $4.6x10^5$, $6.2x10^3$ และ $1.7x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.7x10^5$, $2.8x10^3$ และ $4.4x10^2$ ตามลำดับ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/ต้น มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.4x10^5$, $3.5x10^4$ และ $3.4x10^3$ ตามลำดับ ส่วนกรรมกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $4.5x10^5$, $6.2x10^5$ และ $5.5x10^5$ ตามลำดับ (Table 5)

จากการตรวจปริมาณ BS DOA-WB4 และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง ทั้ง 4 กรรมวิธี มีปริมาณ BS DOA-WB4 แตกต่างกัน คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 มากที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด ส่วนกรรมวิธีที่รดด้วยผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 30 กรัม/น้ำ 20 ลิตร มีปริมาณ BS DOA-WB4 ใกล้เคียงกับ กรรมวิธีที่ใส่ผลิตภัณฑ์แบบผง อัตรา 1 กรัม/หลุม ซึ่งทั้งสองกรรมวิธีก็มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวใกล้เคียงกันด้วย และทั้ง 4 กรรมวิธีมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลดลง ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของทั้ง 4 กรรมวิธีต่ำกว่า และแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* คงที่ไม่ลดลง

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เพื่อหาวิธีการใช้ที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงทดลอง ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเชียงใหม่ อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยปลูกมันฝรั่งตามกรรมวิธีที่วางแผนการทดลองไว้ และทำการตรวจสอบจำนวนต้นมันฝรั่งที่เป็นโรคเหี่ยวทุก 30 วัน พบว่ากรรมวิธีแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง กรรมวิธีรองก้นหลุมก่อนปลูกมันฝรั่ง และกรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่งด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง และรดด้วยผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 7 วัน มีการเกิดโรคเหี่ยว 37.5, 38.0 และ 36.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 3 กรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่เป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ (Table 6)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่ากรรมวิธีแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.4x10^3$, $4.2x10^4$ และ $1.2x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีรองก้นหลุมก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $3.2x10^3$, $5.3x10^4$ และ $4.1x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $2.2x10^3$, $1.3x10^4$ และ $2.3x10^4$ ตามลำดับ (Table 7)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า กรรมวิธีแช่หัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.8x10^4$, $2.3x10^3$ และ $1.1x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีรองก้นหลุมก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $3.6\ x10^4$, $3.2x10^4$ และ $1.7x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ กรรมวิธีคลุกหัวพันธุ์ก่อนปลูกมันฝรั่ง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.2x10^4$, $3.4x10^3$ และ $2.2x10^3$ ตามลำดับ ส่วนกรรมกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $3.5x10^5$, $4.1x10^5$ และ $3.1x10^5$ ตามลำดับ (Table 8)

จากการตรวจปริมาณ BS DOA-WB4 และแบคทีเรีย *R. solanacearum* พบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง คือ กรรมวิธีที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ทั้ง 3 กรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวไม่แตกต่างกันทางสถิติ และทั้ง 3 กรรมวิธีมีปริมาณ BS DOA-WB4 ใกล้เคียงกัน ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวไม่แตกต่างกัน และทั้ง 3 กรรมวิธีมีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* ลดลง ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของทั้ง 3 กรรมวิธีต่ำกว่า และแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ที่มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* คงที่ไม่ลดลง

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร

การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร พบว่าแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ และแปลงเปรียบเทียบ (control) เป็นโรคเหี่ยว 83.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคไม่แตกต่างจากแปลงเปรียบเทียบที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง (Table 9)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า แปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีปริมาณ BS DOA-WB4 เท่ากับ $1.5x10^4$, $3.2x10^5$ และ $5.4x10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Table 10)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกมันฝรั่งทุก 30, 60 และ 90 วัน พบว่า แปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.6x10^5$, $2.3x10^5$ และ $1.1x10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ ส่วนแปลงเปรียบเทียบ (control) มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.2x10^5$, $3.5x10^5$ และ $6.5x10^5$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม ตามลำดับ (Table 11)

Table 1 Population of BS DOA-WB4 that survive in bioproduct powder stored at various temperatures and period of observation.

Month	Populations *of* BS DOA-WB4 (CFU/talcum 1 g.)	
	Room temperature (27 - 30 °C)	Refrigerator (4 - 6 °C)
$0^{1/}$	4.3×10^{10}	4.3×10^{10}
1	3.7×10^{10}	5.3×10^{10}
2	2.3×10^{10}	4.1×10^{10}
3	3.5×10^{9}	5.1×10^{10}
4	1.9×10^{9}	4.9×10^{10}
5	2.1×10^{9}	2.7×10^{10}
6	2.5×10^{8}	2.3×10^{10}
7	2.6×10^{8}	3.1×10^{10}
8	1.8×10^{7}	5.4×10^{9}
9	3.3×10^{5}	4.4×10^{9}
10	3.6×10^{4}	3.6×10^{9}
11	2.4×10^{3}	3.7×10^{9}
12	1.1×10^{2}	8.5×10^{8}
13	-	4.8×10^{8}
14	-	3.9×10^{8}
15	-	7.8×10^{7}

$0^{1/}$ Initial bacterial population

Table 2 Efficiency of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato under screenhouse condition.

week	bioproduct powder			Sterilized distilled water	
	Disease controlling (%)	Bacterial Population (CFU/soil 1 g)		Disease controlling (%)	Bacterial Population (CFU/soil 1 g)
		Ralstonia solanacearum	*Bacillus subtislis*		*Ralstonia solanacearum*
1	100[1/]	4.6×10^6	3.9×10^4	100	3.2×10^6
2	100	3.2×10^5	3.7×10^4	100	4.6×10^6
3	90	1.4×10^5	2.6×10^4	80	2.2×10^7
4	80	5.9×10^4	5.7×10^4	40	5.2×10^7
5	70	3.6×10^4	2.5×10^5	0	6.6×10^6
6	60	2.3×10^4	2.9×10^5	0	8.6×10^5
7	60	5.6×10^3	3.5×10^5	0	7.7×10^5

[1/] Disease controlling (%) = $\frac{\text{number of survival potato}}{\text{total number of potato}} \times 100$

Table 3 The efficiency of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Disease incident %
1. BS DOA-WB4 30 g/20L of water every 7 days	44.1c[1/]
2. BS DOA-WB4 40 g/20L of water every 7 days	26.3b
3. BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	16.9a
4. BS DOA-WB4 1 g/Plant every 7 days	47.8c
5. control	75.9d
CV (%)	19.50

[1/]Mean values within a column followed by the same letter do not differ by Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Table 4 Population of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of BS DOA-WB4 (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
1. BS DOA-WB4 30 g/20L of water every 7 days	2.4×10^2	4.2×10^3	7.3×10^3
2. BS DOA-WB4 40 g/20L of water every 7 days	3.2×10^2	5.3×10^3	3.7×10^4
3. BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	4.6×10^3	5.4×10^5	8.4×10^5
4. BS DOA-WB4 1 g/Plant every 7 days	2.2×10^2	4.2×10^3	6.6×10^3
5. control	-	-	-

Table 5 Population of *R. solanacearum* in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
1. BS DOA-WB4 30 g/20L of water every 7 days	1.9×10^5	4.3×10^3	2.1×10^3
2. BS DOA-WB4 40 g/20L of water every 7 days	4.6×10^5	6.2×10^3	1.7×10^3
3. BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	2.7×10^5	2.8×10^3	4.4×10^2
4. BS DOA-WB4 1 g/Plant every 7 days	2.4×10^5	3.5×10^4	3.4×10^3
5. control	4.5×10^5	6.2×10^5	5.5×10^5

Table 6 Efficacy of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Disease incident (%)
1. tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	37.5a[1/]
2. support BS DOA-WB4 in hole and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	38.0a
1. tuber was gathering dust of BS DOA-WB4 and BS DOA-WB4 50 g/20L 2. of water every 7 days	36.5a
4. control	76.5b
CV (%)	13.5

[1/]Mean values within a column followed by the same letter do not differ by Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Table 7 Population of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of BS DOA-WB4 (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
treatment 1	2.4×10^3	4.2×10^4	1.2×10^4
treatment 2	3.2×10^3	5.3×10^4	4.1×10^4
treatment 3	2.2×10^3	1.3×10^4	2.3×10^4
treatment 4	-	-	-

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days

treatment 2 support BS DOA-WB4 in hole and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days

treatment 3 tuber was gathering dust of BS DOA-WB4 and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days

treatment 4 control

Table 8 Population of *R. solanacearum* in controlling bacterial wilt disease of potato in the field trial.

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
1. treatment 1	1.8×10^4	2.3×10^3	1.1×10^3
2. treatment 2	3.6×10^4	3.2×10^4	1.7×10^3
3. treatment 3	2.2×10^4	3.4×10^3	2.2×10^3
4. treatment 4	3.5×10^5	4.1×10^5	3.1×10^5

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days

treatment 2 support BS DOA-WB4 in hole and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days

treatment 3 tuber was gathering dust of BS DOA-WB4 and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days

treatment 4 control

Table 9 Efficacy of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in a farmer's field

Treatment	Disease incident (%)
1. tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days	76.5
2. control	83.5

Table 10 Population of BS DOA-WB4, bioproduct powder in controlling bacterial wilt disease of potato in a farmer's field

Treatment	Population of BS DOA-WB4 (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
treatment 1	1.5×10^4	3.2×10^5	5.4×10^5
treatment 2	-	-	-

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 2 control

Table 11 Population of *R. solanacearum* in controlling bacterial wilt disease of potato in a farmer's field

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU/soil 1 g)		
	30 days	60 days	90 days
treatment 1	1.6×10^5	2.3×10^5	1.1×10^5
treatment 2	2.2×10^5	3.5×10^5	6.5×10^5

treatment 1 tuber in BS DOA-WB4 solution and BS DOA-WB4 50 g/20L of water every 7 days
treatment 2 control

การทดลองที่ 3.1.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์*Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง

ผลการทดลอง

1. การเตรียมสูตรสำเร็จชนิดเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบNo.4

โดยนำสปอร์ของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 ที่เลี้ยงได้มาปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 10^9 CFU/กรัม นำมาผสมกับเกาลินหรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และกากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร เมื่อนำมาทดสอบความสม่ำเสมอและการกระจายตัวพบว่ามีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ที่ 10^9 cfu/g

2. **ทดสอบความอยู่รอดของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 และระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ**

ทำการตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในสูตรเม็ด ที่แบ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและในตู้เย็นทุก 1 เดือน เป็นระยะเวลา 15 เดือน ผลการทดลอง ผงเชื้อที่ได้เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องมีชีวิตอยู่รอดได้ 12 เดือน แต่ปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนที่ 4 โดยลดลงจาก 4.3×10^9 CFU/g เหลือ $6.1 \times$

10^8 CFU/g และลดลงอย่างรวดเร็วในตั้งแต่เดือนที 8 จนถึงเดือนที่ 12 จาก 5.1 x 10^7CFU/กรัม เหลือเพียง 1.0 x 10^2 CFU/g (ตารางที่ 1) ในขณะที่ผงเชื้อที่เก็บไว้ที่ตู้เย็น(อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส) ยังคงมีชีวิตอยู่รอดได้ถึง 15 เดือนโดยที่ความเข้มข้นลดลงจากเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย จากปริมาณเริ่มต้น4.3 x 10^9 CFU/g ลดลงเหลือ 1.4 x 10^7 CFU/g ในเดือนที่ 15 (ตารางที่ 1)

3. ทดสอบการประสิทธิภาพของสูตรชนิดเม็ดในในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลอง

นำสูตรเม็ดที่ผลิตได้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนปลูกพืชทดลอง โดยปริมาณประชากรของเชื้อ *R. solanacearum* ในดินผสม ซึ่งเป็นประชากรเริ่มต้นคือ 4.3 x 10^6 CFU/ดิน 1 กรัม พบว่า ประสิทธิภาพของผงเชื้อในการควบคุมโรคเหี่ยวในสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกขิง มีเปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค 60 % โดยมีปริมาณของเชื้อ *B. subtilis* 4.4 x 10^4 CFU/ดิน 1 กรัม และมีปริมาณเชื้อ *R. solanacearum* เหลืออยู่เพียง 2.6 x 10^2 CFU/ดิน 1 กรัม ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรค 100% ปริมาณของเชื้อ *R. solanacearum* มีอยู่ 1.6 x 10^4 CFU/ดิน 1 กรัม(ตารางที่ 2) จากผลการทดลองพบว่าสูตรเม็ดแบคทีเรีย *B. subtilis* สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของของในสภาพเรือนปลูกพืชทดลองได้ถึง 60% ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับสูตรผงที่ณัฏฐิมาและคณะ (2551) ได้รายงานไว้ว่าชีวภัณฑ์สูตรผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพโรงทดลองได้ 60 % เช่นกัน และตรงกับที่ ณัฏฐิมาและคณะ (2547) ได้รายงานผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ *B. subtilis* โดยได้รายงานว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในโรงเรือนทดลองได้ 60% เช่นกัน

4. **ทดสอบการประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในแปลงทดลอง**

ผลการทดลองประสิทธิภาพและวิธีการใช้สูตรสำเร็จชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงแปลงทดลองพบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดและสูตรชนิดผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no 4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 45.0 เปอร์เซ็นต์ โดยกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด คือ 21.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรชนิดผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 34.0 และ 32.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่3) และกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดและสูตรชนิดผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no 4 ทุกกรรมวิธีมีผลผลิตขิงมากกว่าและแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 1,750 กิโลกรัม/ไร่ โดยกรรมวิธีการใช้สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น ได้น้ำหนักผลผลิตขิงสูงที่สุด 4,549 กิโลกรัม/ไร่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการวิธีการใช้สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 2,755 กิโลกรัม/ไร่ และ 2,791 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (ตารางที่3)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร

ผลการทดลองประสิทธิภาพของสูตรชนิดเม็ดในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงแปลงเกษตรกร ที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าทุกกรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดและสูตรผงผงแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no 4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว

42.94 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) โดยกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวน้อยที่สุด คือ 26.72 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรชนิดผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยว 31.36 และ 36.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

พบว่ากรรมวิธีที่มีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น ได้น้ำหนักผลผลิตขิงมากที่สุด คือ3,926 กิโลกรัม/ไร่ (ตารางที่ 4) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีใช้น้ำเปล่า) ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 1,926 กิโลกรัม/ไร่ (ตารางที่ 4) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการวิธีการใช้สูตรชนิดเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น และกรรมวิธีสูตรชนิดผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร ที่ได้น้ำหนักผลผลิตขิง 2,992 กิโลกรัม/ไร่ และ 2,888 กิโลกรัม/ไร่ ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตรอดในสูตรเม็ดที่เก็บที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่าง ๆ

เดือนที่	ปริมาณแบคทีเรีย (โคโลนี/มิลลิลิตร)	
	อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส)	ตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส)
0 [1/]	4.3×10^9	4.3×10^9
1	1.7×10^9	4.2×10^9
2	1.2×10^9	3.5×10^9
3	0.2×10^9	4.1×10^9
4	6.1×10^8	5.2×10^9
5	3.3×10^8	3.2×10^9
6	1.2×10^8	2.6×10^9
7	0.9×10^8	2.2×10^9
8	5.1×10^7	8.0×10^8
9	4.2×10^5	7.2×10^8
10	6.3×10^4	8.6×10^8
11	2.2×10^3	8.3×10^8
12	1.0×10^2	3.0×10^8
13	-	3.5×10^8
14	-	2.5×10^8
15	-	1.4×10^7

[1/] **ปริมาณเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้น**

ตารางที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพของสูตรเม็ดแบคทีเรีย*Bacillus subtislis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบno4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนปลูกพืชทดลอง

สัปดาห์ที่	สูตรเม็ด			น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	
	เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรคเหี่ยว	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU* / ดิน 1 กรัม)[2/]		เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรคเหี่ยว	ปริมาณแบคทีเรีย (CFU* / ดิน 1 กรัม)[2/]
		Ralstonia solanacearum	*Bacillus subtislis*		*Ralstonia solanacearum*
1	100[1/]	4.3×10^6	1.9×10^6	100	4.3×10^6
2	100	1.3×10^5	3.5×10^6	100	4.9×10^6
3	90	2.4×10^5	2.6×10^6	80	2.2×10^7
4	80	7.1×10^4	8.7×10^6	40	6.2×10^7
5	70	6.2×10^4	5.4×10^6	0	8.6×10^6
6	60	2.3×10^3	2.5×10^6	0	3.7×10^5
7	60	2.6×10^2	4.4×10^6	0	1.6×10^4

1/ การควบคุมโรค (%) = $\frac{\text{จำนวนต้นรอดตาย}}{\text{จำนวนต้นทั้งหมด}} \times 100$

2/ CFU = หน่วยโคโลนี

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสูตรเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtislis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงทดลอง ที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร จังหวัดลำปาง

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค	ผลผลิต (ก.ก./ไร่)
1.สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น	34.0 b[1/]	66	2,755 b
2.สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น	21.0 a	79	4,549 a
3.สูตรผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร	32.5 b	67.5	2,791 b
4. น้ำเปล่า	45.0 c	-	1,750 c
CV (%)	21.26245		30.96581

1/ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการควบคุมโรคของสูตรเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus subtislis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no 4 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรที่อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	เปอร์เซ็นต์การควบคุมโรค	ผลผลิต (ก.ก./ไร่)
1.สูตรเม็ดอัตรา 1 กรัม/ต้น	31.36 b[1/]	68.64	2,992 ab
2.สูตรเม็ดอัตรา 2 กรัม/ต้น	26.72 a	73.28	3,926 a
3.สูตรผงอัตรา 50 กรัม/20 ลิตร	36.68 b	63.32	2,888 ab
4. น้ำเปล่า	42.94 c	-	1,926 b
CV (%)	24.52837		29.08872

1/ ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแนวตั้ง ไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี DMRT

การทดลองที่ 3.1.3 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ผลการทดลอง

1. ศึกษาการแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์แบคทีเรีย *B.subtilis* ในรูปผง

ผลการทดลอง พบว่า การแปรรูปผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ Bs โดยใช้แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และทัลคัมเป็นสารพา จะได้ปริมาณเซลล์ Bs ในผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมล. ซึ่งสูงกว่าการใช้ปลายข้าว รำข้าว และซีโอไลท์เป็นสารพา ซึ่งมีปริมาณ Bs หลังการผสมปรุงแต่งเท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมล. หลังการเก็บสารชีวภัณฑ์ในสภาพอุณภูมิห้อง (25 $\pm$ 5 องศาเซลเซียส) ไว้เป็นเวลา 15 เดือน พบว่า สารชีวภัณฑ์ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา มีปริมาณ Bs ที่มีชีวิตรอดคงอยู่เท่ากับ 3.8×10^7 เซลล์ต่อมล. ในขณะที่การใช้ปลายข้าว ซีโอไลท์ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และรำข้าว เป็นสารพา มีปริมาณ Bs เหลือประมาณ 10^6 และ 10^5 เซลล์ต่อมล. ตามลำดับ (ตารางที่ 1และภาพที่ 1)

การทดลองเก็บผลิตภัณฑ์ในสภาพตู้เย็นช่องธรรมดา อุณหภูมิ (5 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 เดือน พบว่า การใช้ทัลคัมและแป้งข้าวโพดเป็นสารพา ปริมาณ Bs ในผลิตภัณฑ์มีเหลือเท่ากับ 4.3×10^7 และ 1.0×10^7 เซลล์ต่อมล. ในขณะที่การใช้ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลท์ แป้งสาลี และรำข้าว เป็นสารพา ปริมาณ Bs มีเหลือประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมล. (ตารางที่ 2และภาพที่1)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง 6 ชนิด ในการควบคุมโรคใบจุดในระดับโรงเรือนทดลอง

2.1 <u>การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์</u>

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ Bs ที่ใช้สารพา 6 ชนิด พบว่า ผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ซีโอไลท์ และทัลคัมเป็นสารพา สามารถลดการเกิดโรคได้สูงสุด คือมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.06 และ 0.11 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตรที่ใช้ปลายข้าว แป้งข้าวโพด รำข้าว แป้งสาลี และกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วยผลิตภัณฑ์ Bs ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 1.54 1.96 2.43 3.77 และ 3.82 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

2.2 <u>ทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* สูตรผง</u>

ผลการทดสอบอัตราที่เหมาะสมของผลิตภัณฑ์ Bs สูตรผง พบว่า ที่อัตรา 40 และ 50 กรัม ต่อน้ำ20 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค

ใบจุดเท่ากับ 1.22 และ 1.24 ตามลำดับ โดยที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารแมนโคเซบ 80 % WP ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 0.45 (ตารางที่ 4)

3. ทดสอบการละลายของชีวภัณฑ์ผง ในน้ำธรรมดา

ผลการทดสอบอัตราการละลายของผลิตภัณฑ์ Bs ที่ใช้สารพา 6 ชนิด อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ20 ลิตร ในน้ำธรรมดา พบว่า การใช้แป้งข้าวโพด มีอัตราการละลายน้ำได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่การใช้ทัลคัมเป็นสารพา สำหรับการใช้ ปลายข้าวกล้อง รำข้าว และซีโอไลท์ อัตราการละลายน้ำต่ำสุด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์สูตรผงที่ใช้สารพาหะ 6 ชนิด หลังเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณ *Bacillus subtilis* (cfus/ml)**					
	ปลายข้าว	**รำข้าว**	**ซีโอไลท์**	**แป้งสาลี**	**แป้งข้าวโพด**	**ทัลคัม**
0	6.6×10^7	2.5×10^7	8.3×10^7	1.8×10^8	3.2×10^8	1.4×10^8
1	2.5×10^7	4.2×10^8	1.8×10^7	4.1×10^7	4.9×10^7	1.5×10^8
2	3.4×10^6	1.8×10^7	3.3×10^7	5.8×10^7	5.6×10^7	2.0×10^8
3	1.9×10^6	1.0×10^6	2.2×10^6	8.3×10^7	7.5×10^7	2.7×10^8
4	3.3×10^6	0.8×10^6	1.7×10^6	5.8×10^6	7.7×10^7	1.9×10^7
5	3.3×10^6	1.7×10^6	0.8×10^6	9.2×10^6	1.0×10^6	7.2×10^7
6	6.7×10^6	5.0×10^6	1.6×10^6	8.3×10^6	6.2×10^6	3.0×10^7
7	4.7×10^6	0.8×10^6	6.8×10^6	4.2×10^6	4.5×10^6	1.9×10^7
8	2.33×10^6	2.5×10^6	8.3×10^6	1.6×10^6	5.8×10^6	2.7×10^7
9	1.7×10^6	4.1×10^5	5.8×10^6	3.7×10^6	6.9×10^6	1.25×10^7
10	2.0×10^6	5.3×10^5	8.3×10^6	5.0×10^6	3.4×10^6	2.0×10^7
11	6.3×10^6	2.8×10^5	3.8×10^6	5.8×10^6	9.7×10^6	5.4×10^7
12	5.6×10^6	8.9×10^5	1.8×10^6	8.4×10^6	6.8×10^6	2.1×10^7
13	1.5×10^6	8.3×10^5	1.3×10^6	1.2×10^6	6.5×10^6	3.2×10^7
14	5.0×10^6	1.7×10^5	7.5×10^6	1.7×10^6	7.8×10^6	1.2×10^7
15	4.2×10^6	2.0×10^5	1.9×10^6	1.7×10^6	4.6×10^6	3.8×10^7

ตารางที่ 2 ปริมาณ *Bacillus subtilis* ที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์สูตรผงที่ใช้สารพาหะ 6 ชนิด หลังเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น ช่องธรรมดา อุณหภูมิ 5 $\pm$ 2 เซลเซียส เป็นเวลา 15 เดือน

เดือนที่	**ปริมาณ *Bacillus subtilis* (cfus/ml)**					
	ปลายข้าว	**รำข้าว**	**ซีโอไลท์**	**แป้งสาลี**	**แป้งข้าวโพด**	**ทัลคัม**
0	6.6×10^{7}	2.5×10^{7}	8.3×10^{7}	1.8×10^{8}	3.2×10^{8}	1.4×10^{8}
1	1.7×10^{7}	4.2×10^{7}	0.5×10^{7}	1.0×10^{8}	1.2×10^{8}	1.8×10^{8}
2	2.4×10^{7}	0.8×10^{7}	1.5×10^{7}	6.7×10^{7}	1.7×10^{8}	2.0×10^{8}
3	2.5×10^{6}	0.9×10^{6}	5.9×10^{6}	2.5×10^{7}	1.4×10^{8}	1.2×10^{8}
4	2.0×10^{6}	1.7×10^{6}	0.8×10^{6}	1.3×10^{7}	4.5×10^{7}	1.5×10^{7}
5	1.7×10^{6}	1.9×10^{6}	5.9×10^{6}	1.9×10^{7}	6.5×10^{7}	2.6×10^{7}
6	6.7×10^{6}	4.2×10^{6}	6.7×10^{6}	7.5×10^{6}	4.7×10^{7}	4.4×10^{7}
7	7.5×10^{6}	5.8×10^{6}	9.2×10^{6}	1.3×10^{6}	5.4×10^{7}	5.8×10^{7}
8	1.9×10^{6}	1.1×10^{6}	1.7×10^{6}	6.1×10^{6}	6.2×10^{7}	1.7×10^{7}
9	1.0×10^{6}	1.0×10^{6}	2.5×10^{6}	4.3×10^{6}	4.3×10^{7}	1.9×10^{7}
10	2.1×10^{6}	1.8×10^{6}	1.3×10^{6}	7.5×10^{6}	4.1×10^{7}	2.7×10^{7}
11	1.3×10^{6}	2.0×10^{6}	1.0×10^{6}	1.0×10^{6}	2.8×10^{7}	1.2×10^{7}
12	1.6×10^{6}	6.9×10^{6}	1.4×10^{6}	2.6×10^{6}	2.7×10^{7}	4.3×10^{7}
13	1.3×10^{6}	1.0×10^{6}	1.8×10^{6}	1.0×10^{6}	3.5×10^{7}	3.8×10^{7}
14	2.6×10^{6}	1.0×10^{6}	1.0×10^{6}	5.3×10^{6}	4.0×10^{7}	4.1×10^{7}
15	5.3×10^{6}	4.9×10^{6}	2.2×10^{6}	1.4×10^{6}	1.0×10^{7}	4.3×10^{7}

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์สูตร ผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W1 ที่ใช้สารพา 6 ชนิด ที่ 15 วันหลังการทดสอบ ในสภาพ

โรงเรือน

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
	15 DAI*
T1 (ปลายข้าว)	1.54 b
T2 (รำข้าว)	2.43 b
T3 (แป้งข้าวโพด)	1.96 b
T4 (แป้งสาลี)	3.77 c
T5 (ซีโอไลท์)	0.06 a
T6 (ทัลคัม)	0.11a
T7 (C+)	3.82 c
T8 (C-)	0.00 a
CV (%)	**29.05**

DAI* = Day after inoculation

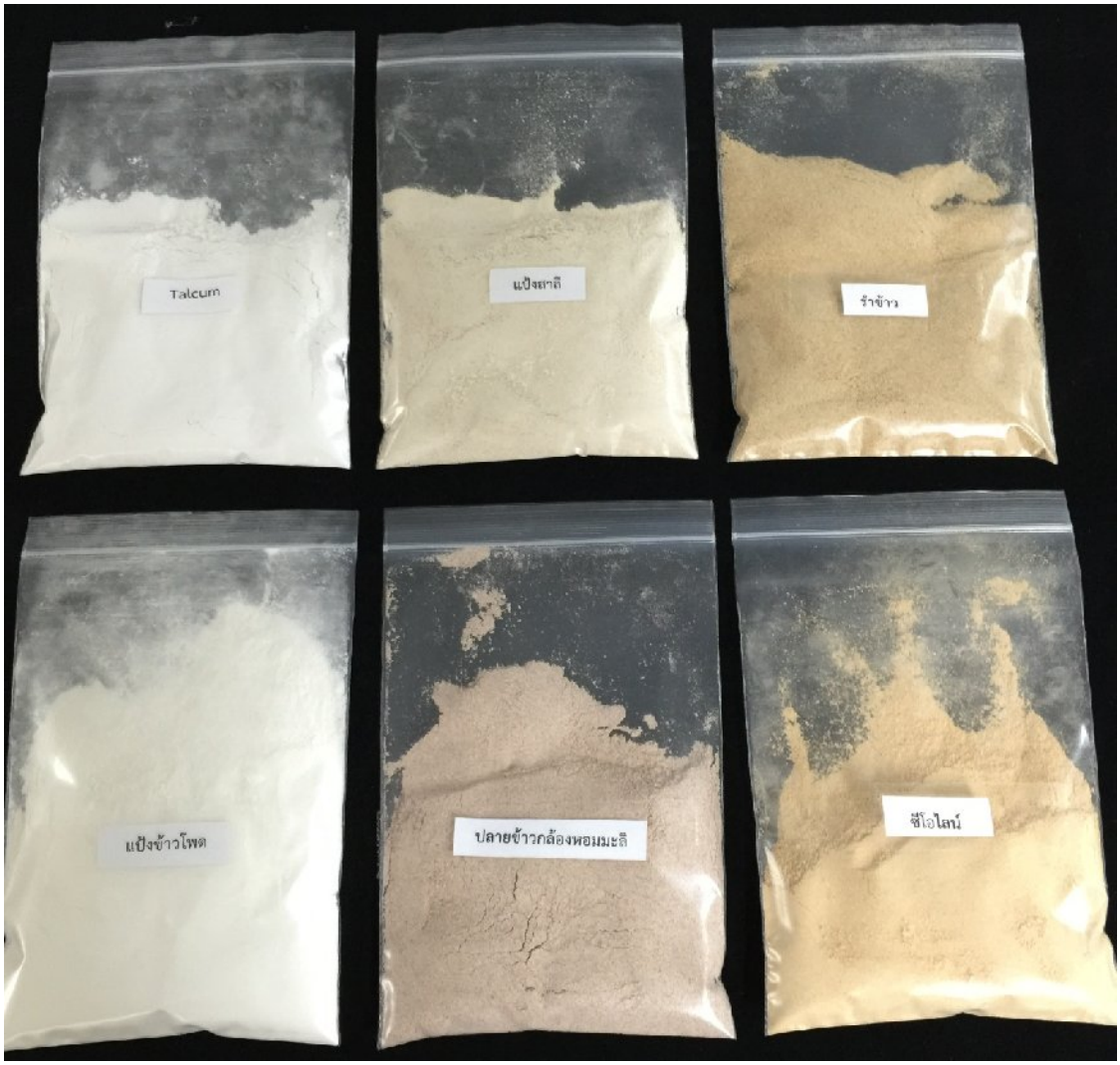
ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ที่พ่นด้วยผลิตภัณฑ์ สูตรผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W1 ที่ใช้ทัลคัมเป็นสารพา อัตรา 20 30 40 และ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ที่ 15 วัน หลังการทดสอบ ในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค**
	15 DAI
T1 (20 กรัม)	1.98 dc
T2 (30 กรัม)	2.66 d
T3 (40 กรัม)	1.22 cb
T4 (50 กรัม)	1.24 cb
T5 (mancozeb 80% WP)	0.45ba
T6 (C+)	1.87 dc
T7 (C-)	0.00 a
CV (%)	**45.0**

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการละลาย ของผลิตภัณฑ์สูตรผงที่ใช้ปลายข้าว รำข้าว ซีโอไลท์ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด และทัลคัม เป็นสารพา ในน้ำธรรมดา อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ที่อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เวลา 5 10 และ 15 นาที

	อัตราการละลาย		
	5 นาที	**10 นาที**	**15 นาที**
ปลายข้าว	++*	++	++
รำข้าว	++	++	++
ซีโอไลท์	++	++	++
แป้งสาลี	++++	++++	++++
แป้งข้าวโพด	+++++	+++++	+++++
ทัลคัม	++++	++++	++++

* +++++ = การละลายดีมาก ไม่เหลือสารตกตะกอน, ++++ = การละลายดี เหลือสารตกตะกอนประมาณ 1%, +++= การละลายปานกลาง เหลือสารตกตะกอน ประมาณ 5%, ++ = การละลายไม่ดี เหลือสารตกตะกอนมากกว่า 5%



ภาพที่ 1 ผลิตภัณฑ์สูตรผง ของ *Bacillus subtilis* 20W1 ที่ใช้สารพา 6 ชนิด ได้แก่ ทัลคัม แป้งสาลี รำข้าว (แถวบน จากซ้ายไปขวา) แป้งข้าวโพด ปลายข้าว ซีโอไลท์ (แถวล่างจากซ้ายไปขวา)

กิจกรรมย่อยที่ 3.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus spp* ในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.2.1 การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ Bacillus ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica*

ผลการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว ในห้องปฏิบัติการ (ปี พ.ศ. 2554)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำหน้าวัว ของแบคทีเรีย Bacillus 85 ไอโซเลทบนอาหาร PDA พบว่า มี Bacillus 15 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 0.040 – 1.355 ซ.ม. โดยพบว่า 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.355 1.205 1.100 1.080 0.870 และ 0.460 ซ.ม. ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำหน้าวัว ในสภาพเรือนทดลอง (ปี พ.ศ. 2554)

ผลการทดสอบการควบคุมโรคเน่าดำหน้าวัว ในโรงเรือน ของ Bacillus 6 ไอโซเลท ได้แก่ GM011 17G5 20W14 19W13 22W11 และ 17G15 พบว่า หลังการทดสอบ 3 5 และ 7 วัน มี Bacillus 3 ไอโซเลท ได้แก่ 17G15 22W11 และ GM011 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำได้ดีกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบ (C+) โดยที่ 3 วันหลังการทดสอบทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถลดอาการแผลเน่าบนใบหน้าวัวได้เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย Bacillus (C+) โดยมีพื้นที่แผลเท่ากับ 0.883 0.916 0.937 ตร.ซม.ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธี C+ มีพื้นที่แผลบนใบหน้าวัวเท่ากับ 1.047 ตร.ซม. แต่ทั้งนี้ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำกล้วยไม้ ในห้องปฏิบัติการ (ปี พ.ศ. 2555)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำกล้วยไม้ 110 ไอโซเลท บนอาหาร PDA พบว่า มี Bacillus 73 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 0.020 – 1.080 ซ.ม. โดยพบว่า 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ 2G24 19W13 8W14 KA2 3G14 และ 2G23 โดยมีค่าเฉลี่ยของ ความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 1.080 1.060 1.010 0.790 0.770 และ 0.770 ซ.ม. ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ ในสภาพเรือนทดลอง (ปี พ.ศ. 2555)

ผลการทดสอบการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ ในโรงเรือน ของ Bacillus 6 ไอโซเลท ได้แก่ 2G24 19W13 8W14 KA2 3G14 และ 2G23 หลังการทดสอบ 3 และ 5 วัน พบว่า ที่ 3 วันหลังการทดสอบ Bacillus ไอโซเลท 19W123 และ 8W14 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus แต่ทั้งนี้ ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus (ตารางที่ 4)

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำสับประรด ในห้องปฏิบัติการ (ปี พ.ศ. 2556)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus 120 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำสับประรด ในห้องปฏิบัติการ พบว่า มี Bacillus จำนวน 77 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหาร PDA ได้ โดยไอโซเลท BK5 1G8 2G23 20W22 และ 20W32 มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยมีความกว้างของ Inhibition zone เท่ากับ 0.91 0.61 0.48 0.46 และ 0.43 ซม. ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

6. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำสับประรด ในสภาพเรือนทดลอง (ปี พ.ศ. 2556)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Bacillus 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคเน่าดำบนต้นสับประรดในโรงเรือนทดสอบ พบว่า Bacillus ทุกไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่แตกต่างกัน และเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสารmetalaxyl 25% WP โดยมีค่าเฉลี่ยของพื้นที่แผลโรคเท่ากับ 0.534 – 0.586 ตร. ซม โดย ไอโซเลท 20W32 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค โดยมีค่าเฉลี่ยของพื้นที่แผลโรคเท่ากับ 0.534 ตร.ซม. ทั้งนี้ ทุกไอโซเลทสามารถควบคุมโรคเน่าดำของสับประรดได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 1 แบคทีเรีย Bacillus 10 ไอโซเลท (จาก 15 ไอโซเลท) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรคเน่าหน้าวัว ในห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone (เซนติเมตร)
7W14	0.130
22W12	0.175
20W33	0.260
22W10	0.425
17G15	0.460
22W11	0.870
19W13	1.080
20W14	1.100
17G5	1.205
GM011	1.355

ตารางที่ 2 พื้นที่แผลโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* บน หน้าวัวที่ถูกยับยั้งโดย Bacillus 6 ไอโซเลท ที่ 3 5 และ 7 วันหลังการ ปลูกเชื้อ

ไอโซเลท/กรรมวิธี	พื้นที่แผล (ตารางเซนติเมตร)		
	3 DAI[1/]	5 DAI[1/]	7 DAI[1/]
C-	0.123 b	0.130	0.199b
17G15	0.883a	1.085	1.337a
22W11	0.916a	1.111	1.380a
GM011	0.937a	1.203	1.230a
C+	1.047a	1.205	1.403a
17G5	1.129a	1.376	1.719a
19W13	1.206a	1.412	1.674a
20W14	1.405a	1.674	1.930a
CV (%)	42.18	49.55	46.13
F (treatments)	3.529*	2.249 ns	2.791*

[1/] DAI : Day after Inoculated : 3 5 และ7 วันหลังการปลูกเชื้อ

ตารางที่ 3 แบคทีเรีย Bacillus 10 ไอโซเลท (จาก 73 ไอโซเลท) ที่มีประสิทธิภาพใน การยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรคเน่ากล้วยไม้ ในห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone (เซนติเมตร)
22W11	0.710
2G7	0.720
29W3	0.730
3G14	0.770
2G23	0.770
20W33	0.770
KA2	0.790
8W14	1.010
19W13	1.060
2G24	1.080

ตารางที่ 4 พื้นที่แผลโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* บนกล้วยไม้ที่ถูกยับยั้งโดย Bacillus 6 ไอโซเลท ที่ 3 และ 5 วันหลังการปลูกเชื้อ

ไอโซเลท/กรรมวิธี	พื้นที่แผล (ตารางเซนติเมตร)	
	3 DAI[1/]	5 DAI[1/]
2G23	1.93a	8.577a
KA2	2.64a	5.17ab
3G14	2.04a	4.38abc
19W13	1.47a	3.56bc
2G24	2.48a	4.48abc
8W14	1.65a	3.15bc
C+	1.75a	3.88bc
C-	0.00b	0.00c
CV	**48.71**	**78.19**
F (treatments)	**3.73 ****	**2.67***

[1/] DAI : Day after Inoculated : 3 และ 5 วันหลังการปลูกเชื้อ

ตารางที่ 5 แบคทีเรีย Bacillus 10 ไอโซเลท (จาก 77 ไอโซเลท) ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเส้นใยเชื้อรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำสับประรดในห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยความกว้างของ Inhibition zone (เซนติเมตร)
15W10	0.340
3G10	0.360
29W2	0.380
2G9	0.410
20W27	0.420
20W32	0.430
20W22	0.456
2G23	0.485
1G8	0.615
BK5	0.910

ตารางที่ 6 พื้นที่แผลโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora parasitica* บน สับประรดที่ถูกยับยั้งโดย Bacillus 5 ไอโซเลท ที่ 7 วันหลังการ การปลูกเชื้อ

ไอโซเลท/กรรมวิธี	พื้นที่แผล (ตารางเซนติเมตร)
	7 DAI[1/]
C-	0.526 b
20W32	0.534 b
Metalaxyl 25% WP	0.538 b
1G8	0.570 b
2G23	0.580 b
BK5	0.582 b
20W22	0.586 b
C+	0.894 a
CV	7.69
F (treatments)	34.04 **

[1/] DAI : Day after Inoculated : 7 วันหลังการปลูกเชื้อ

การทดลองที่ 3.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Erwinia carotovora subsp. carotovora และ E. chrysanthemi สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

ผลการทดลอง

1. การรวบรวม และแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

รวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections ได้จำนวน 58 ไอโซเลท และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ได้อีก 12 ไอโซเลท รวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ใช้ในการทดสอบ จำนวน 70 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) โดยเชื้อแบคทีเรียที่ได้มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA (รูปที่ 6)

2. การรวมรวม และการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

รวบรวมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech อย่างละ 5 ไอโซเลท จาก culture collections โดยคัดเลือกได้จากกล้วยไม้สกุล แวนดา หวาย และช้าง และแยกได้จากสวนของเกษตรกรที่ปลูกกล้วยไม้สกุลหวาย จังหวัดกาญจนบุรี โดยแยกเชื้อแบคทีเรีย Ecc จำนวน 6 ไอโซเลท และ Ech จำนวน 10 ไอโซเลท รวมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ จำนวน 26 ไอโซเลท

ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จำแนกตามลักษณะโคโลนีบนอาหาร NGA คือ กรณีเชื้อแบคทีเรีย Ecc โคโลนีกลมตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว ขอบเรียบ เป็นมัน สีขาวขุ่น ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน ตรงกลางนูนขึ้นเล็กน้อยคล้ายไข่ดาว ขอบเรียบ สีเขียวขี้ม้า (รูปที่ 7 และ 8) เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีตาม Bergey's manual of Determinative Bacteriology (1974) พบว่า สอดคล้องกับลักษณะของเชื้อแบคทีเรีย *E. carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi*

3. การพิสูจน์การเป็นเชื้อสาเหตุโรค

ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ที่แยกได้จากใบกล้วยไม้สกุลหวายที่แสดงอาการเน่าเละ ตามวิธีของ Koch's postulation โดยการฉีด cell suspension ของเชื้อแบคทีเรียบริเวณใบกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่า เชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ทุกสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดอาการเน่าเละบนใบกล้วยไม้สกุลหวายได้ โดยเชื้อแบคทีเรีย Ecc จะแสดงอาการแผลช้ำต่อมาใบเริ่มเน่าเละ ลักษณะใบเน่าเป็นสีเหลืองออกน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นฉุนรุนแรง (รูปที่ 9) ส่วนเชื้อแบคทีเรีย Ech จะแสดงอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละ และแยกจากผิวใบ ทำให้ผิวใบพอง บวมน้ำ และเริ่มเน่า ลักษณะใบเน่าเป็นสีเขียว กลิ่นไม่เหม็นฉุน (รูปที่ 10) จากนั้นนำมาแยกเชื้อบนอาหาร NGA เพื่อพิสูจน์การเกิดโรคตามวิธี Koch's postulation พบลักษณะโคโลนีของเชื้อเป็นแบบเดียวกับที่นำไปปลูกเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 26 ไอโซเลทนั้น เป็นสาเหตุโรคจริง

เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวายหลังทำการปลูกเชื้อที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรีย Ecc และ Ech แต่ละไอโซเลทก่อให้เกิดอาการรุนแรงของโรคแตกต่างกัน ดังนี้ เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK3, EcK4, PA255, EcK1, EcK2 และ EcK5 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4, 3, 3, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA334, PA392, PA283, EhK2, PA521 และ EhK1 มีความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4, 3, 3, 2, 2 และ 2 ตามลำดับ (รูปที่ 11 และตารางที่ 2) จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลท EcK3 และ PA334 ตามลำดับ ซึ่งมีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุด โดยมีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4 เป็นตัวแทนในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech จากที่ได้รวบรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลท ในสภาพห้องปฏิบัติการ

4. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

จากการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK3 และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA334 ที่มีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็ว และมีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูงที่สุด เพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ เพื่อเป็นการคัดเลือกเบื้องต้นของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 70 ไอโซเลท ด้วยวิธี disc diffusion method พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 19 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ ทั้งใน Ecc และ Ech โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.22 - 1.45 มิลลิเมตร (มม.) (ตารางที่ 3)

5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใช้เชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech มากกว่าหนึ่งไอโซเลท โดยเลือกเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทที่มีระดับที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคสูง และมีระยะเวลาในการก่อให้เกิดโรครวดเร็วรองลงมา อย่างละ 5 ไอโซเลท ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย Ecc ไอโซเลท EcK4, PA255, EcK1, EcK2, และ EcK5 และเชื้อแบคทีเรีย Ech ไอโซเลท PA392, PA283, EhK2, PA521, และ EhK1 เพื่อทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่มีศักยภาพ พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคเน่าเละ Ecc และ Ech ได้ดีทุกสายพันธุ์ ได้แก่ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 โดยพบ clear zone การยับยั้งเป็นบริเวณกว้างเฉลี่ย 0.2 - 1.0 มม. (รูปที่ 12 และตารางที่ 4 - 5)

6. ทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรค และวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย

จากการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคและวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum (300 - 600 mesh) ลงไปในสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย (bacterial suspension) เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผลบนใบกล้วยไม้ก่อนการ spray ด้วย bacterial suspension พบว่า การปลูกเชื้อโดยการทำแผลเป็นวิธีปลูกเชื้อดีที่สุด เนื่องจากอัตราการเกิดโรคสม่ำเสมอ ซึ่งต่างจากการปลูกเชื้อโดยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum เพราะอัตราการเกิดโรคไม่สม่ำเสมอ สำหรับผลการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรค พบว่า ที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^8 cfu/ml เชื้อแบคทีเรีย Ecc มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเร็วที่สุดภายในเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ Ech แสดงอาการเน่าเละภายในเวลา 24 ชั่วโมง ถือว่าความเข้มข้นที่ 10^8 cfu/ml มีรุนแรงในการก่อโรคสูงเหมาะนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียโรคเน่าเละ

7. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน

จากการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ได้แก่ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วน ไอโซเลท 17W18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc (รูปที่ 13)

8. ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพสวน

จากการสำรวจสวนกล้วยไม้ที่มีปัญหาโรคเน่าเละ ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech พบว่า สวนของ คุณอนุสรณ์ พรหรรษาวิจิต ณ บ้านเลขที่ 23 หมู่ที่ 6 ตำบลสวนหลวง อำเภอกระทุ่มแบน จังหวัดสมุทรสาคร มีการระบาดของโรคเน่าเละเสมอๆ ซึ่งจากการสำรวจและเก็บตัวอย่าง พบเฉพาะเชื้อแบคทีเรีย Ecc จึงแยกเก็บเชื้อ Ecc ไว้เพื่อไว้ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้ในสภาพสวนต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc หรือ Ech สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพสวน โดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12, 17W18 และ Bkku ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพสวน พบว่า กรณีที่มีการทำแผลก่อนปลูกด้วยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรค พบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BK12 ที่สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้ถึง 80% ส่วนเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5 และ BK9 ยังพบอาการเน่าเละถึง 60-70% (รูปที่ 16 และตารางที่ 5) ส่วนกรณีที่ไม่ได้ทำแผลก่อนปลูกเชื้อ พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทุกไอโซเลทได้แก่ BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc สาเหตุโรคเน่าเละเฉลี่ยถึง 85-95% (รูปที่ 17 และตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 การรวมรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อปฏิปักษ์[1/]
1	ดินรากกล้วย
2	ดินคลองหลวง2
3	ดินชุมแพ
4	ดินเลน
5	อ้อย 4
6	อ้อย 6
7	ดินรากยาสูบ 4
8	ปุ๋ยคอก
9	ดินปุ๋ยคอก
10	ดินรากยาสูบ 2
11	SA
12	4120
13	4415
14	19W17
15	8W14
16	13W5
17	19W43
18	13W7
19	19W36
20	7W14
21	19W2
22	16W3
23	19W6
24	16W5
25	19W34

ตารางที่ 1 การรวมรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อปฏิปักษ์[1/]
26	9W14
27	19W14
28	19W41
29	19W1
30	19W13c
31	19W4
32	19W42
33	19W16
34	19W38
35	20W11
36	8W14
37	3G23
38	17G17
39	22W8
40	17W18
41	20W32
42	3G12
43	19W16
44	20W1
45	2G19
46	20W22
47	3G14
48	3G11
49	20W4
50	20W33

ตารางที่ 1 การรวมรวมเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลทเชื้อปฏิปักษ์[1/]
51	17G4
52	20W23
53	20W28
54	20W17
55	2G4
56	16W2
57	20W43
58	20W33
59	BK1
60	BK2
61	BK3
62	BK4
63	BK5
64	BK6
65	BK7
66	BK8
67	BK9
68	BK10
69	BK11
70	BK12

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-58 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections
ลำดับที่ 59-70 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี

ตารางที่ 2 ระดับความรุนแรงอาการของโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวายหลังทำการปลูกเชื้อที่ 24 ชั่วโมง

แหล่งที่มา[1/]	***E. carotovora* subsp. *carotovora***		***E. chrysanthemi***	
	ไอโซเลท	[2/]**ระดับความรุนแรง**	**ไอโซเลท**	[2/]**ระดับความรุนแรง**
culture collections	PA246	1	PA283	3
	PA249	1	**PA334**	**4**
	PA250	1	PA392	3
	PA251	1	PA521	2
	PA255	3	PA523	1
แยกเก็บบริเวณผิวใบ	EcK1	2	EhK1	2
	EcK2	2	EhK2	2
	EcK3	**4**	Ehk3	1
	EcK4	3	EhK4	1
	EcK5	2	EhK5	1
	Eck6	1	EhK6	1
			EhK7	1
			EhK8	1
			EhK9	1
			EhK10	1
รวม	Ecc 11 โซเลต		Ech 15 ไอโซเลท	

[1/] แหล่งที่มา: culture collections = ศูนย์เก็บเชื้อ culture collections, แยกเก็บบริเวณผิวใบ = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี

[2/] ระดับความรุนแรงของโรค 0 ถึง 4 โดยที่ ระดับ 0 คือไม่ปรากฏอาการของโรค
ระดับ 1, 2, 3 และ 4 หมายถึง แสดงอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้รุนแรง เท่ากับ 1-25, 26-50, 51-75 และ 76-100 เปอร์เซ็นต์ต่อพื้นที่ใบทั้งหมดของกล้วยไม้ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ขนาดความกว้างของการยับยั้ง (clear zone) เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK3 และ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA334 โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 19 ไอโซเลท หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

ลำดับที่	ไอโซเลทแบคทีเรีย[1/]	บริเวณยับยั้ง (มม.)[2/]	
		Erwinia carotovora subsp. *carotovora* (EcK3)	*Erwinia chrysanthemi* (PA334)
1	**BK2**	**0.8**	**1.0**
2	BK3	0.4	0.7
3	**BK5**	**0.82**	**0.83**
4	BK6	0.5	0.54
5	BK7	0.31	0.65
6	BK8	0.45	1.08
7	**BK9**	**0.65**	**1.0**
8	BK10	0.36	0.5
9	**BK12**	**0.7**	**1.0**
10	20W28	0.34	0.45
11	**17W18**	**0.54**	**0.7**
12	8W14	0.45	0.25
13	2G4	0.42	1.45
14	19W13	0.4	0.46
15	3G14	0.36	0.28
16	20W22	0.45	0.32
17	20W1	0.47	0.56
18	20W17	0.46	0.22
19	20W23	0.5	0.44

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-9 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ลำดับที่ 10-19 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections

[2/] บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร): วัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

ตารางที่ 4 ขนาดความกว้างของการยับยั้ง (clear zone) เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

ลำดับ	ไอโซเลท[1/]	บริเวณยับยั้ง (มม.)[2/]					
		EcK3	EcK4	PA255	EcK1	EcK2	EcK5
1	BK2	0.8	0.3	0.35	0.4	0.39	0.3
2	BK5	0.82	0.41	0.42	0.52	0.48	0.41
3	BK9	0.65	0.32	0.35	0.34	0.53	0.24
4	BK12	0.7	0.35	0.3	0.24	0.39	0.5
5	17W18	0.54	0.21	0.34	0.2	0.32	0.2

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-4 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ลำดับที่ 5 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections

[2/] บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร): วัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

ตารางที่ 5 ขนาดความกว้างของการยับยั้ง (clear zone) เชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 5 ไอโซเลท หลังการทดสอบ 72 ชั่วโมง

ลำดับ	ไอโซเลท[1/]	บริเวณยับยั้ง (มม.)[2/]					
		PA334	PA392	EhK2	PA283	PA521	EhK1
1	BK2s	1.0	0.53	0.53	0.51	0.3	0.5
2	BK5s	0.83	0.48	0.3	0.3	0.4	0.4
3	BK9s	1.0	0.6	0.7	0.47	0.3	0.54
4	BK12s	1.0	0.3	0.32	0.2	0.31	1.0
5	17W18c	0.7	0.47	0.2	0.22	0.25	0.35

[1/] เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: ลำดับที่ 1-4 = แยกเก็บบริเวณผิวใบจากสวนของเกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี ลำดับที่ 5 = จากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections

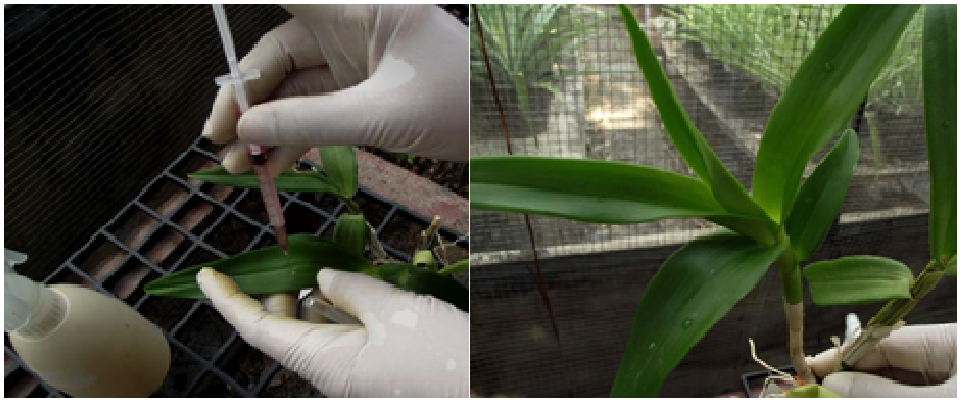
[2/] บริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร): วัดความกว้างรัศมีบริเวณใส (clear zone) จากขอบโคโลนีของเชื้อถึงขอบบริเวณใส

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวายหลังการปลูกเชื้อที่ 48 ชั่วโมง

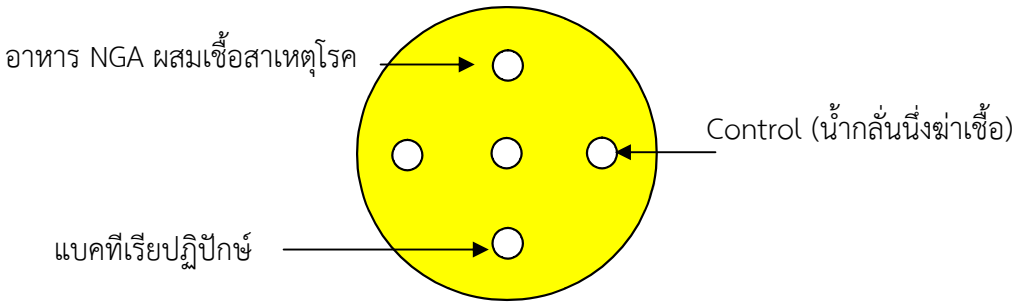
ลำดับที่	กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (%)	
		ทำแผล	ไม่ทำแผล
1	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2	65%	5%
2	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK5	60%	10%
3	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK9	70%	15%
4	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK12	20%	5%
5	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท 17W18	60%	15%
6	พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)	10%	5%
7	น้ำเปล่า ปลูกเชื้อ (Control)	100%	95%
8	น้ำเปล่า ไม่ปลูกเชื้อ (Control)	-	-

รูปที่ 1 ลักษณะอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย จากสวนของเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการแผลช้ำ ต่อมาใบเริ่มเน่าเละ ลักษณะใบเน่าเป็นเหลืองออก น้ำตาล และกลิ่นเหม็นฉุนรุนแรง

รูปที่ 2 ลักษณะอาการโรคเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย จากสวนของเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี โดยใบกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละ และแยกจากผิวใบ ทำให้ผิวใบพอง บวม น้ำและเริ่มเน่า ลักษณะใบเน่าเป็นสีเขียวและกลิ่นไม่เหม็นฉุน

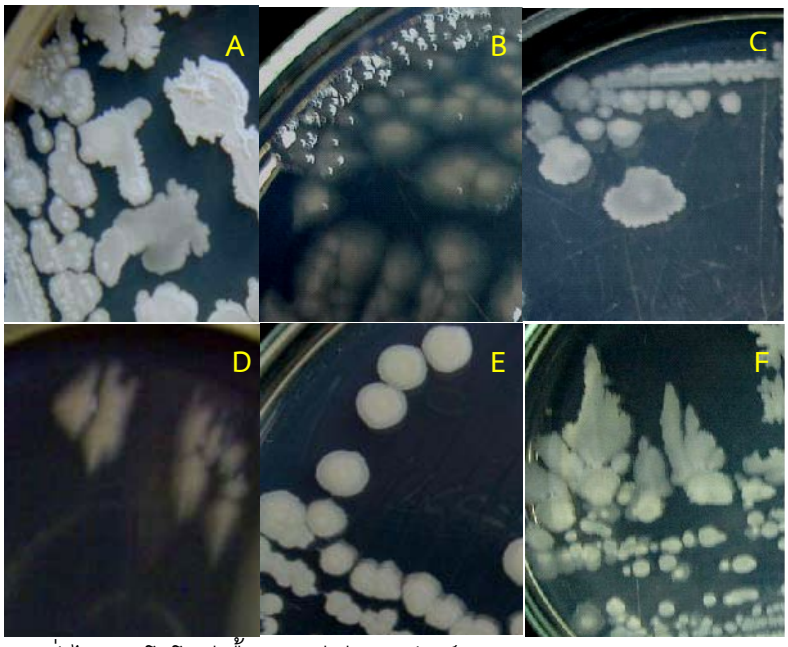


รูปที่ 3 ลักษณะการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละบนกล้วยไม้สกุลหวาย ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ



รูปที่ 4 แสดงการวางกระดาษกรอง โดยวางกระดาษกรองที่หยดเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 7 ไมโครลิตร 4 จุดต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนตรงกลางวางกระดาษกรองที่หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นกรรมวิธีในการเปรียบเทียบ

รูปที่ 5 ลักษณะการปลูกฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนกล้วยไม้สกุลหวาย



รูป**ที่ 6** ลักษณะทั่วไปของโคโลนีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

A: สีขาว ด้าน รูปร่างไม่แน่นอน ขอบหยัก

B: สีขาว ด้าน ตรงกลางนูน ขอบหยัก

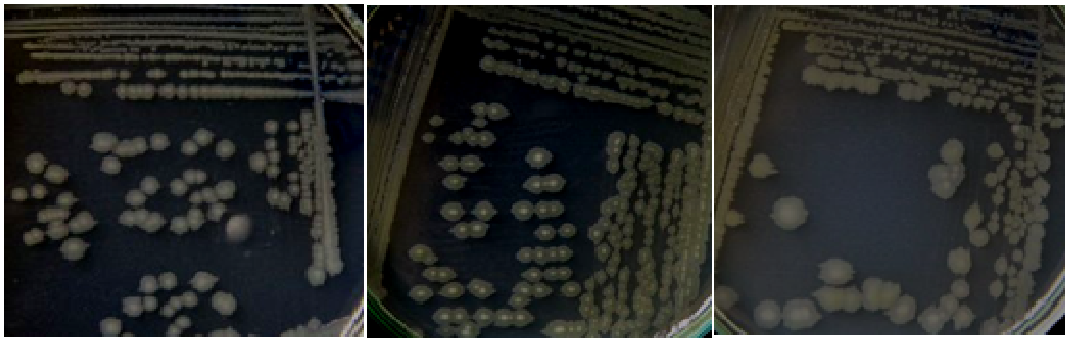
C: สีเหลืองอ่อน กลม ตรงกลางยุบ ขอบเรียบ

D: สีเหลืองน้ำตาล รูปร่างไม่แน่นอน ผิวขรุขระเล็กน้อย ขอบหยัก

E: สีขาว ด้าน กลมแบน ขอบเรียบ

F: สีเหลืองคล้ายนมข้น มัน นูน ขอบเรียบ

รูปที่ 7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia. carotovora* subsp. *carotovora* บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia. chrysanthemi* บนอาหาร Nutrient glucose agar (NGA) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

รูปที่ 9 โรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* บนกล้วยไม้สกุลหวาย ลักษณะอาการใบเน่าเป็นสีเหลืองออกน้ำตาล และมีกลิ่นเหม็นฉุนรุนแรง หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 10 โรคเน่าเละที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia chrysanthemi* บนกล้วยไม้สกุลหวาย ลักษณะอาการใบเน่าเละ เนื้อเยื่อเละแยกจากผิวใบ พบอาการผิวใบพอง หลังการปลูกเชื้อ 24 ชั่วโมง

รูปที่ 11 ความรุนแรงอาการของโรคเน่าและที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; A-F และ *E. chrysanthemi*; G-L ที่ปรากฏบนใบกล้วยไม้สกุลหวาย หลังทำการปลูกเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อใบ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

A: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK3 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4

B: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK4 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3

C: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท PA255 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3

D: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK1 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2

E: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK2 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2

F: เชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora* ไอโซเลท EcK5 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2

G: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA334 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 4

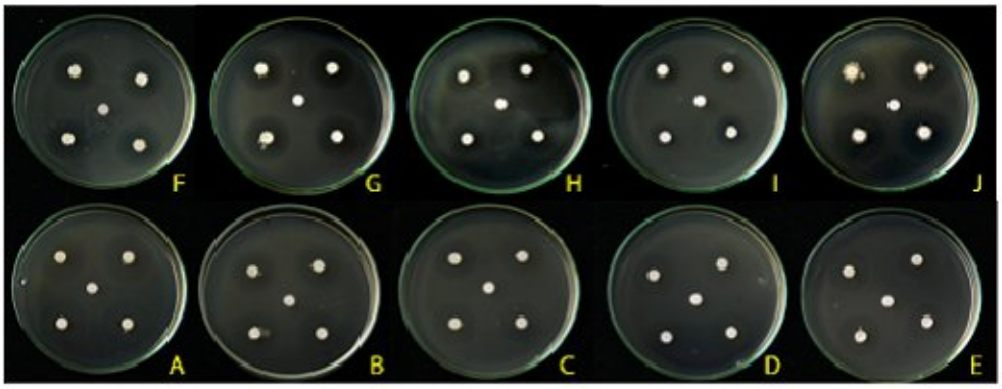
H: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA392 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3

I: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA283 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 3

J: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท EhK2 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2

K: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท PA521 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2

L: เชื้อ *E. chrysanthemi* ไอโซเลท EhK1 มีรุนแรงของโรคอยู่ในระดับ 2



รูปที่ 12 บริเวณวงใส (clear zone) จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* ด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์

(A) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

(B) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

(C) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK9 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

(D) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

(E) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 17W18 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. carotovora* subsp. *carotovora*

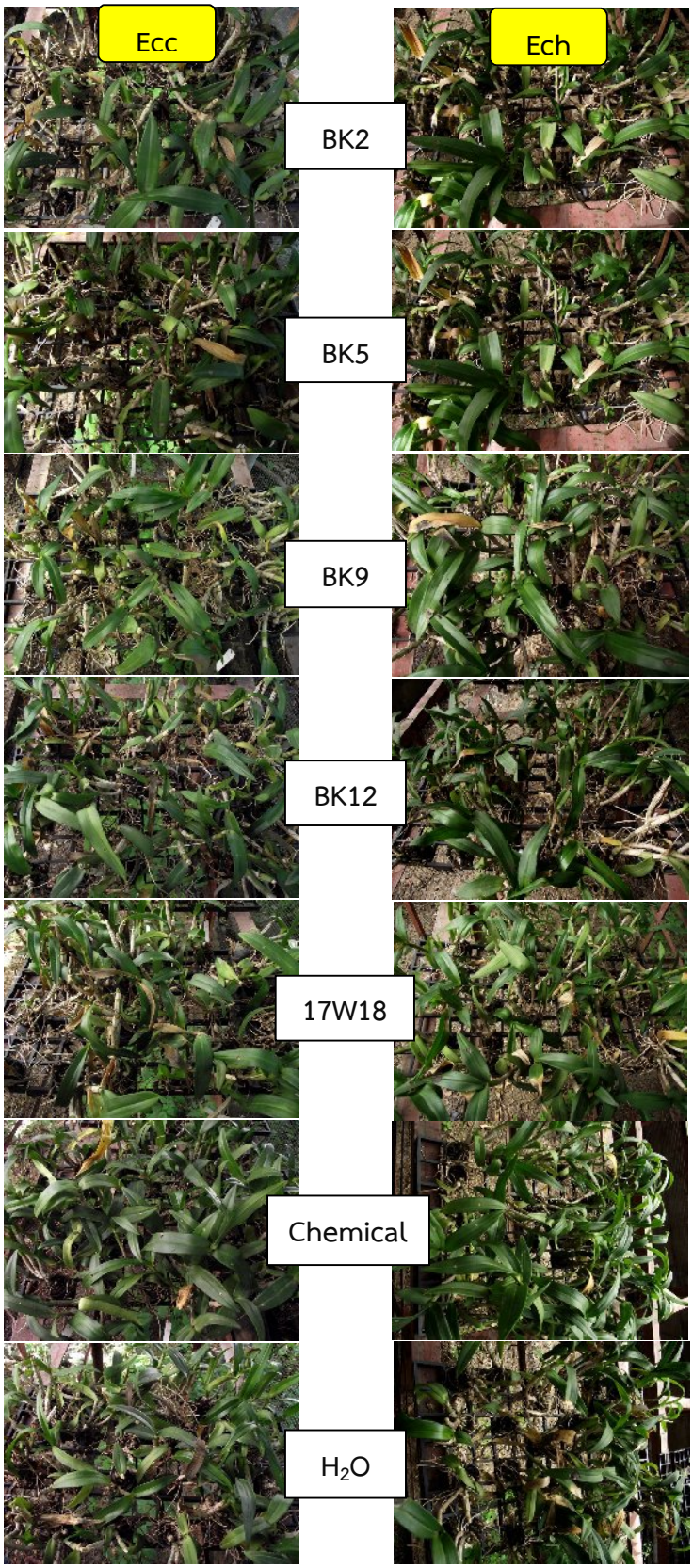
(F) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*

(G) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK5 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*

(H) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK9 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*

(I) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK12 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*

(J) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 17W18 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. chrysanthemi*



รูปที่ 13 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech).ในสภาพโรงเรือน

รูปที่ 14 เตรียมแปลงทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech).ในสภาพสวน

รูปที่ 15 ทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech).ในสภาพสวน

รูปที่ 16 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) ในสภาพสวน ด้วยวิธีทำแผลก่อนปลูกเชื้อ

(A) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK2

(B) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK5

(C) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK9

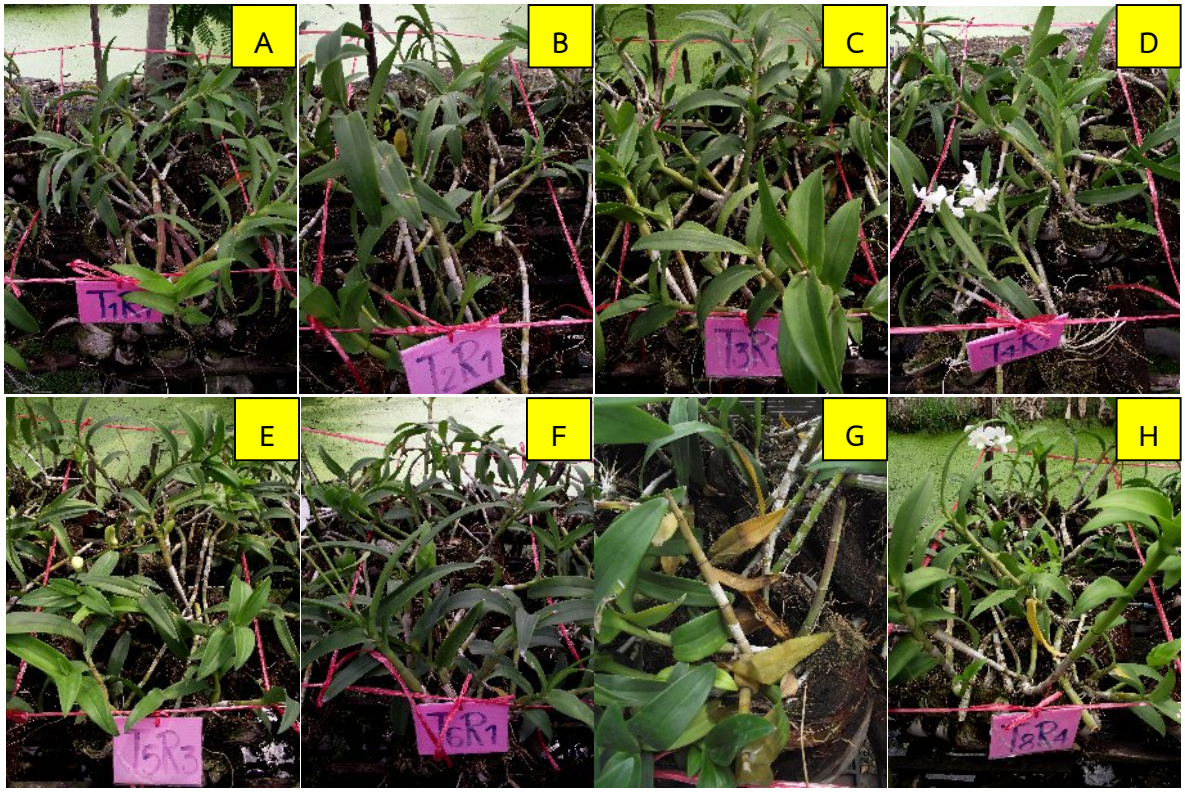
(D) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK12

(E) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 17W18

(F) พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)

(G) น้ำเปล่า ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

(H) น้ำเปล่า ไม่ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)



รูปที่ 17 ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) ในสภาพสวน ด้วยวิธีไม่ทำแผลก่อนปลูกเชื้อ

(A) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK2

(B) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK5

(C) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK9

(D) *Bacillus* sp. ไอโซเลท BK12

(E) *Bacillus* sp. ไอโซเลท 17W18

(F) พ่นสารเคมี (แคงเกอร์-เอ็กซ์)

(G) น้ำเปล่า ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

(H) น้ำเปล่า ไม่ปลูกเชื้อ (กรรมวิธีเปรียบเทียบ)

nonglux.k@doa.in.th

การทดลองที่ 3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา *Rhizoctonia solani*
ผลการทดลอง

1.การศึกษาประสิทธิภาพของสารป้องกันกำจัดโรคพืชต่อเชื้อ R. solani ในห้องปฏิบัติการ

1.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อรา R. solani และการแยกเชื้อ

ผลการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่มีลักษณะอาการกาบใบไหม้หรือจุดของข้าวโพด ได้รวบรวมตัวอย่างพืชที่แสดงลักษณะอาการไหม้หรือจุดแหล่งปลูกพืชจังหวัดนครราชสีมา นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method ตรวจสอบลักษณะของเชื้อที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถแยกได้เชื้อ R. solani ต่อจากนั้นพิสูจน์โรคโดยวิธีของ Koch (Kock ' s postulate) ย้ายเชื้อเก็บรักษาในหลอดอาหารเพื่อเป็น stock culture สำหรับทดสอบต่อไป

1.2 การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA เมื่อเชื้อราอายุ 2 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อนำมาวางตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ใช้ loop ที่เผาไฟฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบททีเรียทดสอบไอโซเลทต่างๆ ที่เลี้ยงบนอาหาร RNV อายุ 24 ชั่วโมง ลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *Rhizoctonia solani* โดยขีดเชื้อจุลินทรีย์มีความยาว 1 ซม. จำนวน 4 จุด ตรงข้ามกันในแนวกากบาทให้ห่างจากเชื้อรา 4 ซม. วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 ซ้ำ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Rhizoctonia solani* ในแต่ละไอโซเลทเปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อราเพียงอย่างเดียว คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* จำนวน 13 ไอโซเลท นำไปทดสอบในขั้นต่อไป(ตารางที่ 1-3)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ในสภาพเรือนทดลอง

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *R. solani* จำนวน 13 ไอโซเลท มาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ในสภาพเรือนทดลองที่มีการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยของเชื้อรา *R. solan* จากการประเมินการเกิดโรคครั้งที่ 5 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ระหว่าง 29.6-55.6 คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* จำนวน 7 ไอโซเลท นำไปทดสอบในขั้นต่อไป(ตารางที่ 4)

3 การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา*R. solani* ในแปลงทดลอง

นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ ที่ได้ผ่านการคัดเลือกจากห้องปฏิบัติการและเรือนทดลองมาแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัด เชื้อรา *R. solani* มาทดสอบผลในการควบคุมโรคในสภาพแปลงทดลอง จากการประเมินการเกิดโรคครั้งที่ 5 พบว่ากรรมวิธีพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 13 (20 W 7) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุดคือ 17.02 ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 3 (XM40), 4 (14 G 12), 6 (18 G 6), 7 (C B 7), 8 (14 W 8), 10 (11 W 1) และ isolate ที่ 13 (20 W 7) เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 22.81, 22.95, 22.97, 21.61, 23.01และ 23.37 ตามลำดับ แต่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 31.61 กรรมวิธีพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 3 (XM40), 4 (14 G 12), 6 (18 G 6), 7 (C B 7), 8 (14 W 8), 10 (11 W 1) และ isolate ที่ 13 (20 W 7) ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า (ตารางที่ 5)

การทดลองที่ 3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides*

ผลการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธีพ่นด้วย Cell suspension

ผลการทดลองการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. โดยวิธีพ่นด้วยCell suspension ในพริกรุ่นที่ 1 พบว่า กรรมวิธีพ่นด้วย *Bacillus* spp. ไอโซเลท 20W16 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่ำสุด เท่ากับ 47.76 รองลงมา ได้แก่ กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W33 1G8 20W5 และ 22W8 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 53.95 57.75 59.60 และ 64.50 ตามลำดับ โดยที่ทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชแมนโคเซบ 80% WP ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 54.61 ทั้งนี้กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W16 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ 7 ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 71.68 (ตารางที่ 1)

ผลการทดลอง พริกรุ่นที่ 2 พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย *Bacillus* spp.ทุกไอโซเลท และกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืชแมนโคเซบ 80% WP ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยไอโซเลท 20W33 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่ำสุด เท่ากับ 43.89 รองลงมาได้แก่ กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท 20W16 22W8 1G8 และ 20W5 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 46.36 46.85 49.45 และ 55.25 ตามลำดับ โดยที่กรรมวิธีที่พ่นด้วยสารฯแมนโคเซบ 80% WP มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 45.33 ทั้งนี้ กรรมวิธีที่พ่นด้วยไอโซเลท20W33 20W16 22W8 และ 1G8 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วย *Bacillus* spp. อย่างมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 69.08 (ตารางที่2)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธีพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์สูตรผง

ผลการทดลอง พริก รุ่นที่ 1 พบว่า กรรมวิธีที่พ่นด้วย *Bacillus* spp.ไอโซเลท B23 อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ20ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่ำสุด เท่ากับ 22.47 และต่ำกว่ากรรมวิธีที่พ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิม 50% WP ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 37.96 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่กรรมวิธีที่พ่นด้วย ***B. subtilis*** ไอโซเลท 20W33 อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ20ลิตร และพ่นด้วย *Bacillus* spp. ไอโซเลท B23 อัตรา 40 และ 30 กรัมต่อน้ำ20ลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 28.59 29.99 และ31.02 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกรรมวิธีที่พ่นด้วยสารคาร์เบนดาซิม 50% WP ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเท่ากับ 37.96 (ตารางที่ 3)

ในพริกรุ่นที่ 2 ไม่สามารถเก็บผลผลิตมาตรวจผลได้ เนื่องจากพริกโดนการเข้าทำลายของโรคไวรัสจนติดผลผลิตไม่เพียงพอต่อการตรวจเช็ค จึงไม่สามารถนำข้อมูลมาสรุปผลการทดลองได้ ดังนั้นไอโซเลท B23 ซึ่งได้ผลการทดลองเพียง 1 การทดลอง จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันยันผลการทดลองอีกครั้ง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธีการแช่ผลพริก

ผลการทดลอง พบว่า ผลพริกที่แช่ด้วยสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ก่อนปลูกเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่อัตรา 10 20 30 และ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผลโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก เท่ากับ 0.86 0.87 0.96 และ 1.07 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยที่ทุกกรรมวิธีมีขนาดแผลโรคแอนแทรคโนสเล็กกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการแช่ผลพริกด้วยผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* ซึ่งมีขนาด

แผลเท่ากับ 1.22 เซนติเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกรรมวิธีที่แช่ผลพริกด้วยสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร มีขนาดแผลโรคแอนแทรคโนสเล็กที่สุด คือมีขนาดแผลโรคแอนแทรคโนสเท่ากับ 0.86 เซนติเมตร (ตารางที่ 4)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ในการยับยั้งเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ติดมากับเมล็ดพริก โดยวิธีคลุกเมล็ด

ผลการทดลอง พบว่า กรรมวิธีที่คลุกเมล็ดพริกติดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* อัตรา 10 20 30 40 และ 50 กรัม มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เมล็ดลดลงทุกอัตรา คือมีเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 48.5 42.0 46.0 40.5 และ 31.5 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่คลุกสารชีวภัณฑ์ Bs ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *C. gloeosporioides* เท่ากับ 64.5 และกรรมวิธีที่คลุกสารชีวภัณฑ์ Bs อัตรา 20-40 กรัม มีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกด้วยสารคาร์บอกซิน 75% WP ซึ่งมีเปอร์เซนต์การติดเชื้อราเท่ากับ 35.0 (ตารางที่ 5)

ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการทดลองของปฏิมาพรและคณะ (2551) ซึ่งทำการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ *Bacillus megaterium* SBK5.7 และ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 ในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนสของเมล็ดพันธุ์พริกชี้ฟ้าโดยวิธี standard blotter plate พบว่าการแช่เมล็ดพริกชี้ฟ้าด้วยเชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 ผสมกับ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 มีประสิทธิภาพในการลดระดับความรุนแรงในการเกิดโรคเท่ากับ 41.90% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้เชื้อ *B. megaterium* SBK5.7 หรือ *Bacillus* sp. SPT41.1.3 เพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสสาเหตุจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* บนผลพริก เมื่อพ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ทดสอบที่แปลงเกษตรกร อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี (พริกรุ่นที่ 1)

กรรมวิธี/Bacillus spp.	**การเกิดโรคแอนแทรคโนส (%) (7 DAI) ***
T1 (20W16)	47.76 ba
T2 (22W8)	64.50 cb
T3 (1G8)	57.75 cba
T4 (20W33)	53.95 cba
T5 (20W5)	59.60 cb
T6 (mancozeb)	54.61 cba
T7 (C+)	71.68 c
T8 (C-)	39.15 a
CV (%)	**19.79**

* DAI = Day after inoculation

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสสาเหตุจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* บนผลพริก เมื่อพ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. 5 ไอโซเลท ทดสอบที่แปลงเกษตรกร อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี (พริกรุ่นที่ 2)

กรรมวิธี/Bacillus spp.	**การเกิดโรคแอนแทรคโนส (%) (7 DAI) ***
T1 (20W16)	46.36 ba
T2 (22W8)	46.85 ba
T3 (1G8)	49.45 ba
T4 (20W33)	43.89 ba
T5 (20W5)	55.25 cba
T6 (mancozeb)	45.33 ba
T7 (C+)	69.08 c
T8 (C-)	42.82 a
CV (%)	**19.58**

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสสาเหตุจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* บนผลพริก เมื่อพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ สูตรผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 2016 20W33 และ *Bacillus* spp. ไอโซเลท B23 ที่อัตรา 30 40 และ 50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ทดสอบที่แปลงเกษตรกร อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี

กรรมวิธี/*Bacillus* spp.	**การเกิดโรคแอนแทรคโนส (%) (7 DAI) ***
T1	48.55 d
T2	46.55 d
T3	45.70 d
T4	50.44 d
T5	46.42 d
T6	28.59cb
T7	31.02 cb
T8	29.99 cb
T9	22.47ba
T10	37.96dc
T11 (C+)	69.23 e
T12 (C-)	12.92 a
CV (%)	**23.96**

ตารางที่ 4 ขนาดแผลโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* จากการทดสอบการแช่ผลพริกด้วยสารชีวภัณฑ์สูตรผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W16 ที่อัตรา 10 20 30 และ 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ต่อพริก 1 กิโลกรัม ที่ 5 วัน หลังการทดสอบ

กรรมวิธี	**เส้นผ่าศูนย์กลางของแผลโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก (ซ.ม.)**
T1 (40 กรัม)	0.86b
T2 (30 กรัม)	0.87b
T3 (20 กรัม)	0.96cb
T4 (10 กรัม)	1.07c
T5 (น้ำเปล่า; C+)	1.22d
T6 (ผลพริก; C-)	0.00a
CV (%)	**10.67**

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์เมล็ดพริกที่ติดเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides* หลังจากการคลุกด้วยสารชีวภัณฑ์ สูตรผง *Bacillus subtilis* ไอโซเลท 20W16 เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการคลุกเมล็ด

กรรมวิธี	**เปอร์เซ็นต์เมล็ดพริกที่ติดเชื้อรา *C. gloeosporioides***
T1 (50 กรัม)	48.5 c
T2 (40 กรัม)	42.0 cba
T3 (30 กรัม)	46.0 cb
T4 (20 กรัม)	40.5 cba
T5 (10 กรัม)	31.5 a
T6 (คาร์บอกซิน)	35.0 ba
T7 (C-)	64.5 d
CV (%)	**16.48**

การทดลองที่ 3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd.) Bult. & Bisby สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องปฏิบัติการ

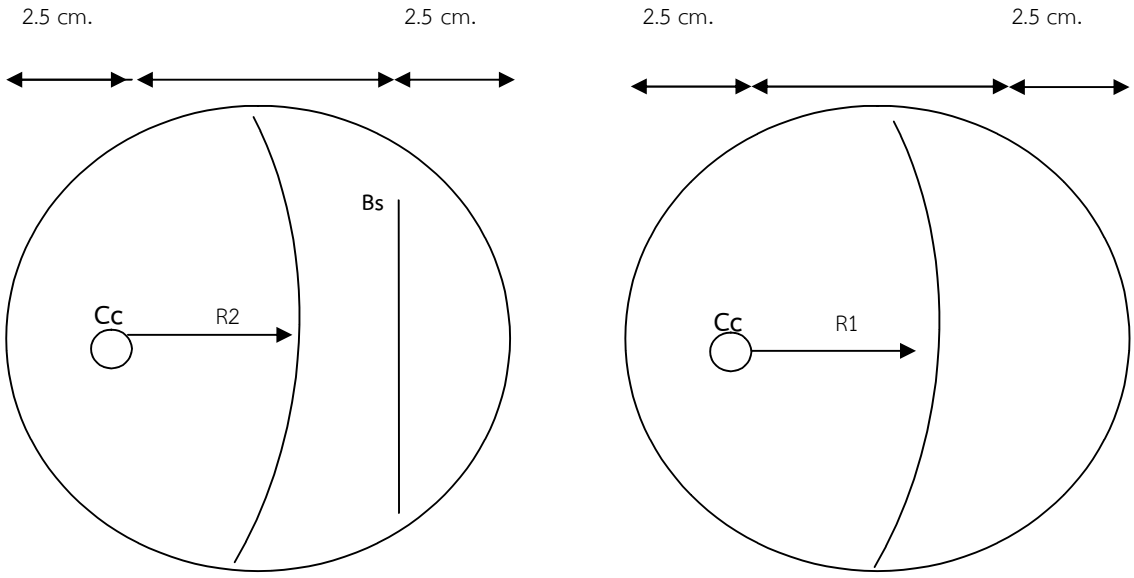
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 107 สายพันธุ์ ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยของรา *C. capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธี dual culture technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ พบว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B23/2, 20W15, 20W19และ 19W6 มีประสิทธิภาพสูงสุด ยับยั้งการเจริญของเส้นใยของรา *C. capsici* โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเส้นใย 58.80 51.03 50.69 และ 51.71 ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรีย *B. subtilis* ทั้ง 4

สายพันธุ์ เพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *C. capsici* ในสภาพเรือนทดลองต่อไป (ตารางที่ 1)

แบคทีเรีย *B. subtilis* ที่นำมาทดสอบครั้งนี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *C. capsici* ทำให้เชื้อเจริญได้ช้ากว่าปกติเมื่อเปรียบเทียบกับจานควบคุมและพบบริเวณใส (clear zone) ระหว่างโคโลนีของแบคทีเรียและเชื้อรา สอดคล้องกับการศึกษาของ Whipps (1987) พบว่า แบคทีเรีย *B. subtilis* จะมีการสร้างสารปฏิชีวนะสารออกมายับยั้งทำให้เกิด clear zone มีผลทำให้เชื้อราสาเหตุโรคเจริญได้ช้าลงหรือหยุดการเจริญได้ และจากการศึกษาของ Kupper *et al*. (2003) ที่ศึกษาการใช้เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* เพื่อควบคุมเชื้อรา *C. acutatum* สาเหตุโรค postbloom fruit drop ของส้ม พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสาร metabolite มายับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี dual culture technique ส่วนแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ 20W16 ตามรายงานของ บุษราคัม และณัฏฐิมา (2549,2550) ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำมาทดสอบยับยั้งการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *C. capsici* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. capsici* ได้ 46.92 เปอร์เซ็นต์

การทดสอบประสิทธิภาพของ *B. subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริกในเรือนทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียในการเจริญของรา *C. capsici* บนผลพริก ในเรือนปลูกพืชทดลอง เมื่อทำการปลูกเชื้อ *C. capsici* สาเหตุโรคบนผลพริก และพ่น *B. subtilis* ตามกรรมวิธีที่กำหนด พบว่า ทุกกรรมวิธีทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสต่ำ โดยเฉพาะในกรรมวิธีเปรียบเทียบมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสต่ำกว่า 5 จึงยังไม่สามารถสรุปประสิทธิภาพแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่นำมาทดลองได้ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะการวัดผลการเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (Bs) **ต่อเชื้อรา** *Colletotrichum capsici* (Cc) โดยวิธี Dual culture technique

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

Bacillus subtilis	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (เปอร์เซ็นต์)[1/]
B23/2	58.8000 A[2/]
19W6	51.7100 B
20W15	51.0260 BC
20W19	50.6860 BCD
22W8	49.6580 BCDE
11W2	49.6560 BCDE
20W13	48.9720 BCDEF
B25	48.4000 BCDEFG
20W14	47.6040 BCDEFGH
11W20	47.6040 BCDEFGH
20W5	47.2600 BCDEFGH
20W16	46.9200 BCDEFGHI
19W45	46.2360 BCDEFGHIJ
B1	46.0000 BCDEFGHIJK
B13	46.0000 BCDEFGHIJK
19W5	45.2100 BCDEFGHIJKL
20W10	45.2080 BCDEFGHIJKL
7W43	45.2060 BCDEFGHIJKL
B2	45.2000 BCDEFGHIJKL
B16	45.2000 BCDEFGHIJKL
11W4	44.9800 BCDEFGHIJKL
7W3	44.8660 BCDEFGHIJKL
20W16	44.8660 BCDEFGHIJKL
20W7	44.8640 BCDEFGHIJKL
B4	44.8000 CDEFGHIJKLMN
B36	44.8000 CDEFGHIJKLMN
B37	44.4000 DEFGHIJKLMNO
B32	44.0000 EFGHIJKLMNOP
B43	44.0000 EFGHIJKLMNOP
B34	44.0000 EFGHIJKLMNOP
7W7	43.8360 EFGHIJKLMNOPQ
19W11	43.4940 EFGHIJKLMNOPQR
20W9	43.4920 EFGHIJKLMNOPQR
B3	43.2000 EFGHIJKLMNOPQRS
B26	43.2000 EFGHIJKLMNOPQRS

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ

[2/] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Ducan’s Multiiple Rang Test

ตารางที่ 1 (ต่อ) ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อการยับยั้ง

การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

Bacillus subtilis	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (เปอร์เซ็นต์)[1/]	
7W1	42.8120	FGHIJKLMNOPQRST[2/]
19W31	42.8100	FGHIJKLMNOPQRST
B24	42.8000	FGHIJKLMNOPQRST
B48	42.8000	FGHIJKLMNOPQRST
B46	42.8000	FGHIJKLMNOPQRST
B35	42.4000	GHIJKLMNOPQRST
B12	42.4000	GHIJKLMNOPQRST
B14	42.0000	GHIJKLMNOPQRSTU
S68	41.7800	HIJKLMNOPQRSTU
B20	41.6000	HIJKLMNOPQRSTU
B6	41.6000	HIJKLMNOPQRSTU
B18	41.6000	HIJKLMNOPQRSTU
B50	41.6000	HIJKLMNOPQRSTU
Sb4	41.4380	HIJKLMNOPQRSTU
B44	41.2000	HIJKLMNOPQRSTU
11W22	41.0980	HIJKLMNOPQRSTU
20W35	41.0960	HIJKLMNOPQRSTU
B22	40.8000	IJKLMNOPQRSTU
Sb9	40.4120	JKLMNOPQRSTU
Sb17	40.0700	KLMNOPQRSTUV
19W3	40.0660	KLMNOPQRSTUV
B5	40.0000	KLMNOPQRSTUV
B17	40.0000	KLMNOPQRSTUV
W1.1	39.6000	LMNOPQRSTUVW
B42	39.6000	LMNOPQRSTUVW
B45	39.2000	MNOPQRSTUVW
11W33	38.7020	MNOPQRSTUVW
B7	38.4000	NOPQRSTUVW
B15	38.4000	NOPQRSTUVW
19W32	38.3580	NOPQRSTUVW
B40	38.0000	OPQRSTUVWX
19W33	37.6720	PQRSTUVWXY
W2.1	37.6000	PQRSTUVWXY
S68	37.3300	QRSTUVWXYZ
B19	37.2000	RSTUVWXYZ
B39	36.8000	STUVWXYZa
19W15	36.3020	TUVWXYZa[2/]

[1/]ค่าเฉลี่ยจาก 10 ซ้ำ

[2/]ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Ducan's Multiiple Rang Test

ตารางที่ 1 (ต่อ) ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ต่างๆ ต่อการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici*

Bacillus subtilis	การยับยั้งการเจริญของเส้นใย (เปอร์เซ็นต์)[1/]	
19W26	35.6140	UVWXYZab
11W13	33.5580	VWXYZab
20W33	33.2160	WXYZab
11W12	31.8480	XYZabc
11W13	31.8460	XYZabc
11W10	31.5040	YZabcd
B11	31.2000	Zabcd
11W21	31.1620	Zabcd
20W6	31.1600	Zabcd
19W4	30.8200	abcd
11W11	30.8160	abcd
19W12	29.7920	bcde
11W18	29.7900	bcde
B21	26.8000	cdef
W2.2	25.6000	cdefg
11W1	25.3420	defg
19W40	24.6540	efg
19W10	23.9700	efgh
11W25	23.6340	efgh
11W5	23.2860	fgh
B27	23.2000	fgh
11W14	20.2060	ghi
B29	18.4000	hij
B10	18.4000	hij
B28	17.2000	ij
B41	16.8000	ijk
B30	16.4000	ijk
B9	12.8000	jkl
1G8	11.3000	kl
B38	11.2000	kl
B31	10.0000	lm
B8	7.6000	lmn
B33	5.2000	mno
W1.3	4.0000	no
CV (%)	11.62	

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

[2/] ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยวิธี Ducan’s Multiiple Rang Test

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกหลังจากพ่น *Bacillus subtilis* carbendazim 50% W/V SC20 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตรและน้ำเปล่า 2 ครั้ง

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค[1/] หลังพ่นครั้งที่ 1	หลังพ่นครั้งที่ 2
1. *B. subtilis* B23 /2	1.84	1.00
2. *B. subtilis* 20W15	2.03	1.03
3. *B. subtilis* 20W19	1.92	1.52
4. *B. subtilis* 19W6	1.85	0.00
5. *B. subtilis* 20W16	2.05	1.43
6. carbendazim 50% W/V SC20 มล.ต่อน้ำ 20 ลิตร	2.06	1.78
7.น้ำเปล่า	1.73	1.06

[1/] ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (ค่าเฉลี่ย 4 ซ้ำ) คำนวณจากสูตร = $\frac{\text{จำนวนผลพริกที่เกิดโรค} \times 100}{\text{จำนวนผลพริกทั้งหมด}}$

การทดลองที่ 3.2.6 การควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no.2 และ UB no.25 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพแปลงทดลอง (ปี 2557)

ทำการตรวจสอบจำนวนต้นพริกที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no. 2, UB no.25 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20ลิตรทุก 15 วัน และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นโรคเหี่ยว 9.2, 10.0, 9.2, 11.7 และ 10.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 1)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกพริกทุกเดือน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนสิงหาคม พบว่ากรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 มีปริมาณ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 เท่ากับ $1.1x10^3$, $1.7x10^2$, $2.3x10^3$, $2.4x10^2$, $1.2x10^3$, $3.1x10^3$ และ $2.7x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* DOA-WB4 มีปริมาณ *B. subtilis* DOA-WB4 เท่ากับ $1.2x10^2$, $2.2x10^3$, $2.9x10^2$, $3.1x10^3$, $1.1x10^3$, $1.1x10^4$ และ $1.5x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.2 มีปริมาณ *B. subtilis* UB no.2 เท่ากับ $2.2x10^2$, $2.4x10^2$, $1.9x10^3$, $2.3x10^3$, $1.4x10^3$, $2.1x10^3$ และ $2.9x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.25 มีปริมาณ *B. subtilis* UB no.25 เท่ากับ $3.2x10^3$, $2.7x10^3$, $2.8x10^2$, $3.5x10^2$, $4.1x10^3$, $5.1x10^3$ และ $3.1x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (Table 2)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกพริกทุกเดือน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนสิงหาคม พบว่ากรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.1x10^4$, $2.1x10^4$, $1.8x10^3$,

$2.4x10^3$, $5.1x10^3$, $2.4x10^3$ และ $2.6x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* DOA-WB4 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.3x10^4$, $1.4x10^4$, $2.5x10^3$, $1.1x10^3$, $2.1x10^4$, $2.2x10^3$ และ $2.8x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.2 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.4x10^4$, $1.7x10^3$, $1.6x10^4$, $1.2x10^3$, $2.1x10^3$, $3.1x10^3$ และ $3.3x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.25 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $3.2x10^4$, $2.2x10^3$, $1.9x10^4$, $3.1x10^4$, $1.6x10^3$, $2.1x10^3$ และ $1.5x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $3.3x10^4$, $2.8x10^4$, $4.1x10^3$, $3.4x10^4$, $5.1x10^3$, $6.1x10^3$ และ $2.2x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (Table 3)

การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no.2 และ UB no.25 ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพแปลงทดลอง (ปี 2558)

ทำการตรวจสอบจำนวนต้นพริกที่เป็นโรคเหี่ยวทุกเดือน พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no. 2, UB no.25 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20ลิตรทุก 15 วัน และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นโรคเหี่ยว 7.5, 5.0, 6.25, 5.0 และ 3.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 4)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกพริกทุกเดือน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนสิงหาคม พบว่ากรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 มีปริมาณ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 เท่ากับ $1.3x10^3$, $1.1x10^3$, $1.3x10^3$, $2.1x10^3$, $2.2x10^3$, $1.1x10^4$ และ $2.2x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* DOA-WB4 มีปริมาณ *B. subtilis* DOA-WB4 เท่ากับ $2.3x10^2$, $1.2x10^2$, $2.4x10^2$, $2.1x10^3$, $3.1x10^3$, $1.4x10^3$ และ $1.3x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.2 มีปริมาณ *B. subtilis* UB no.2 เท่ากับ $3.2x10^2$, $2.2x10^2$, $1.5x10^3$, $2.2x10^3$, $1.1x10^3$, $2.2x10^3$ และ $2.4x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.25 มีปริมาณ *B. subtilis* UB no.25 เท่ากับ $1.2x10^3$, $2.5x10^3$, $2.1x10^2$, $1.5x10^2$, $3.1x10^3$, $3.1x10^3$ และ $1.1x10^4$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (Table 5)

ผลการตรวจปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากแปลงปลูกพริกทุกเดือน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึง เดือนสิงหาคม พบว่ากรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.1x10^4$, $1.1x10^4$, $1.4x10^4$, $2.2x10^3$, $3.1x10^3$, $2.1x10^3$ และ $2.3x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* DOA-WB4 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.2x10^4$, $1.3x10^4$, $2.1x10^3$, $2.1x10^4$, $2.3x10^4$, $3.2x10^4$ และ $2.4x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.2 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.1x10^4$, $1.3x10^4$, $1.2x10^4$, $3.2x10^3$, $3.1x10^3$, $2.1x10^3$ และ $1.3x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม กรรมวิธีรดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* UB no.25 มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $1.2x10^4$, $2.4x10^4$, $1.5x10^4$, $2.1x10^3$, $1.4x10^3$, $2.5x10^3$ และ $3.5x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรีย *B. subtilis* มีปริมาณแบคทีเรีย *R. solanacearum* เท่ากับ $2.3x10^4$, $2.4x10^4$, $3.1x10^3$, $3.2x10^3$, $4.1x10^3$, $2.1x10^3$ และ $3.2x10^3$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม (Table 6)

Table 1 Efficacy of antagonistic *B. subtilis* for control bacterial wilt disease of chili in the field trial. (2014)

Treatment	Disease incident (%)
1. *B. subtilis* strain tobacco root soil no.4 50 g/20L of water every 15 days	9.2ns[1/] 10.0
2. *B. subtilis* strain DOA-WB4 50 g/20L of water every 15 days	9.2
3. *B. subtilis* strain UB no.2 50 g/20L of water every 15 days	11.7
4. *B. subtilis* strain UB no.25 50 g/20L of water every 15 days	10.8
5. control	
CV (%)	12.25

[1/]Mean values within a column followed by the same letter do not differ by Duncan's Multiple Range Test (P < 0.05)

Table 2 Population of antagonistic *B. subtilis* for control bacterial wilt disease of chili in the field trial. (2014)

Treatment	Population of antagonistic *B. subtilis* (CFU / soil 1g)						
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug
treatment 1	$1.1x10^3$	$1.7x10^2$	$2.3x10^3$	$2.4x10^2$	$1.2x10^3$	$3.1x10^3$	$2.7x10^4$
treatment 2	$1.2x10^2$	$2.2x10^3$	$2.9x10^2$	$3.1x10^3$	$1.1x10^3$	$1.1x10^4$	$1.5x10^4$
treatment 3	$2.2x10^2$	$2.4x10^2$	$1.9x10^3$	$2.3x10^3$	$1.4x10^3$	$2.1x10^3$	$2.9x10^3$
treatment 4	$3.2x10^3$	$2.7x10^3$	$2.8x10^2$	$3.5x10^2$	$4.1x10^3$	$5.1x10^3$	$3.1x10^3$
treatment 5	-	-	-	-	-	-	-

treatment 1 *B. subtilis* strain tobacco root soil no.4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 2 *B. subtilis* strain DOA-WB4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 3 *B. subtilis* strain UB no.2 50 g/20L of water every 15 days
treatment 4 *B. subtilis* strain UB no 25 50 g/20L of water every 15 days
treatment 5 control

Table 3 Population of *R. solanacearum* for control bacterial wilt disease of chili in the field trial. (2014)

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU / soil 1g)						
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug
treatment 1	$1.1x10^4$	$2.1x10^4$	$1.8x10^3$	$2.4x10^3$	$5.1x10^3$	$2.4x10^3$	$2.6x10^3$
treatment 2	$1.3x10^4$	$1.4x10^4$	$2.5x10^3$	$1.1x10^3$	$2.1x10^4$	$2.2x10^3$	$2.8x10^3$
treatment 3	$2.4x10^4$	$1.7x10^3$	$1.6x10^4$	$1.2x10^3$	$2.1x10^3$	$3.1x10^3$	$3.3x10^3$
treatment 4	$3.2x10^4$	$2.2x10^3$	$1.9x10^4$	$3.1x10^4$	$1.6x10^3$	$2.1x10^3$	$1.5x10^3$
treatment 5	$3.3x10^4$	$2.8x10^4$	$4.1x10^3$	$3.4x10^4$	$5.1x10^3$	$6.1x10^3$	$2.2x10^4$

treatment 1 *B. subtilis* strain tobacco root soil no.4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 2 *B. subtilis* strain DOA-WB4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 3 *B. subtilis* strain UB no.2 50 g/20L of water every 15 days
treatment 4 *B. subtilis* strain UB no 25 50 g/20L of water every 15 days
treatment 5 control

Table 4 Efficacy of antagonistic *B. subtilis* for control bacterial wilt disease of chili in the field trial. (2015)

Treatment	Disease incident (%)
1. *B. subtilis* strain tobacco root soil no.4 50g/20L of water every 15 days	7.5ns[1/]
2. *B. subtilis* strain DOA-WB4 50 g/20L of water every 15 days	5.0
3. *B. subtilis* strain UB no.2 50 g/20L of water every 15 days	6.25
4. *B. subtilis* strain UB no 25 50 g/20L of water every 15 days	5.0
5. control	3.75
CV (%)	12.25

[1/]Mean values within a column followed by the same letter do not differ by Duncan's Multiple Range Test ($P < 0.05$)

Table 5 Population of antagonistic *B. subtilis* for control bacterial wilt disease of chili in the field trial. (2015)

Treatment	Population of antagonistic *B. subtilis* (CFU / soil 1g)						
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug
treatment 1	$1.3x10^3$	$1.1x10^3$	$1.3x10^3$	$2.1x10^3$	$2.2x10^3$	$1.1x10^4$	$2.2x10^4$
treatment 2	$2.3x10^2$	$1.2x10^2$	$2.4x10^2$	$2.1x10^3$	$3.1x10^3$	$1.4x10^3$	$1.3x10^4$
treatment 3	$3.2x10^2$	$2.2x10^2$	$1.5x10^3$	$2.2x10^3$	$1.1x10^3$	$2.2x10^3$	$2.4 x10^3$
treatment 4	$1.2x10^3$	$2.5x10^3$	$2.1x10^2$	$1.5x10^2$	$3.1x10^3$	$3.1x10^3$	$1.1x10^4$
treatment 5	-	-	-	-	-	-	-

treatment 1 *B. subtilis* strain tobacco root soil no.4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 2 *B. subtilis* strain DOA-WB4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 3 *B. subtilis* strain UB no.2 50 g/20L of water every 15 days
treatment 4 *B. subtilis* strain UB no 25 50 g/20L of water every 15 days
treatment 5 control

Table 6 Population of *R. solanacearum* for control bacterial wilt disease of chili in the field trial. (2015)

Treatment	Population of *R. solanacearum* (CFU / soil 1g)						
	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug
treatment 1	$2.1x10^4$	$1.1x10^4$	$1.4x10^4$	$2.2x10^3$	$3.1x10^3$	$2.1x10^3$	$2.3x10^3$
treatment 2	$1.2x10^4$	$1.3x10^4$	$2.1x10^3$	$2.1x10^4$	$2.3x10^4$	$3.2x10^4$	$2.4x10^3$
treatment 3	$2.1x10^4$	$1.3x10^4$	$1.2x10^4$	$3.2x10^3$	$3.1x10^3$	$2.1x10^3$	$1.3x10^3$
treatment 4	$1.2x10^4$	$2.4x10^4$	$1.5x10^4$	$2.1x10^3$	$1.4x10^3$	$2.5x10^3$	$3.5x10^3$
treatment 5	$2.3x10^4$	$2.4x10^4$	$3.1x10^3$	$3.2x10^3$	$4.1x10^3$	$2.1x10^3$	$3.2x10^3$

treatment 1 *B. subtilis* strain tobacco root soil no.4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 2 *B. subtilis* strain DOA-WB4 50 g/20L of water every 15 days
treatment 3 *B. subtilis* strain UB no.2 50 g/20L of water every 15 days
treatment 4 *B. subtilis* strain UB no 25 50 g/20L of water every 15 days
treatment 5 control

การทดลองที่ 3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani*

ผลการทดลอง

1. การทดสอบการผลของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 10 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA ทดสอบโดยวิธี Dual plate technique (ตารางที่ 1)

จากการทดลอง พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่นำมาทดสอบ สามารถสร้าง inhibition zone หรือพื้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท แต่มีระดับความกว้างของพื้นที่แตกต่างกันจากมากไปหาน้อย คือไอโซเลท 17G18, 22W10, 20W12, 20W16, 17G15, 20W5, 20W4, 2G4, 19W42 และ 20W8 เท่ากับ 1.23, 1.14, 1.10, 1.08, 1.03, 0.94, 0.82, 0.81, 0.76 และ 0.65 เซนติเมตร ตามลำดับ จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท 17G18, 22W10, 20W12, 20W16 และ 17G15 ไปทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการ soil infestation ต่อไป

ตารางที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 10 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA

ไอโซเลท	ความกว้างของพื้นที่การยับยั้ง (Inhibition zone) [1/] (เซนติเมตร)
2G4	0.81 c [2/]
17G15	1.03 b
17G18	1.23 a
19W42	0.76 cd
20W4	0.82 c
20W5	0.94 c
20W8	0.65 d
22W10	1.14 ab
20W12	1.10 ab
20W16	1.08 b
CV (%)	16.7

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 10 จานอาหาร PDA (10 ซ้ำ)

[2/] ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 95% DMRT

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการ soil infestation (ตารางที่ 2)

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก ที่ 7, 14 และ 21 วันหลังราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. แล้วนำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวา เปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง พบว่า

ในวันที่ 7 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของเชื้อ *B. subtilis* ในอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง พบว่า กรรมวิธีการราดด้วยเชื้อ *B.*

subtilis ไอโซเลท 17G15, 17G18, 20W12, 20W16, 22W10 และ กรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไม่พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก 78.30 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 14 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของเชื้อ *B. subtilis* ในอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง พบว่า กรรมวิธีการราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 17G15, 17G18, 20W12, 20W16, 22W10 มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 14.50, 0, 8.50, 61.30 และ 53.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไม่พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก 100.00 เปอร์เซ็นต์ หรือต้นแตงกวาที่งอกได้แสดงอาการเหี่ยวตายทั้งหมด

ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของเชื้อ *B. subtilis* ในอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง พบว่า กรรมวิธีการราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 17G15, 17G18, 20W12, 20W16, 22W10 มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 25.30, 3.50, 12.30, 96.30 และ 87.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไม่พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก 100.00 เปอร์เซ็นต์ หรือต้นแตงกวาที่งอกได้แสดงอาการเหี่ยวตายทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* 5 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวาที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. solani* หลังการทดลอง 21 วัน พบว่า กรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 17G18 มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยทำให้จำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 3.50 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* อีก 4 ไอโซเลท ขณะที่ กรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 มีประสิทธิภาพรองลงมา โดยมีจำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 12.30 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* อีก 3 ไอโซเลท ส่วนกรรมวิธีการราด *B. subtilis* ไอโซเลท 17G15 มีจำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 25.30 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 และ 22W10 ที่มีจำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 96.30 และ 87.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ต้นแตงที่แสดงอาการเหี่ยวหรือเมล็ดไม่งอกที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากปลูกในดินที่มีเชื้อ *F. solani* แล้วราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. ในสภาพโรงเรือนทดลอง

กรรมวิธี	จำนวนต้นแตงที่แสดงอาการเหี่ยวหรือเมล็ดไม่งอก[1/] (%)		
	7 DAI [2/]	14 DAI	21 DAI
ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 17G15	0.00 a [3/]	14.50 b	25.30 c
ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + ราด *B. subtilis* 17G18	0.00 a	0.00 a	3.50 a
ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* +ราด *B. subtilis* 20W12	0.00 a	8.50 b	12.30 b
ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* +ราด *B. subtilis* 20W16	5.30 b	61.30 c	96.30 d
ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* +ราด *B. subtilis* 22W10	0.00 a	53.20 c	87.00 d
ดินคลุกเชื้อรา *F. solani* + น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	78.30 c	100 d	100 d
ดินไม่คลุกเชื้อรา *F. solani* + ไม่ราด *B. subtilis*	0.00	0.00	0.00
CV (%)	13.7	12.5	11.4

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 กระถาง

[2/] จำนวนวันหลังปลูกเชื้อ

[3/] ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95% DMRT

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation (ตารางที่ 3)

เมื่อทดสอบประสิทธาภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก ที่ 7, 14 และ 21 วันหลังราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. แล้วนำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวา เปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง พบว่า

ในวันที่ 7 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก 67.30 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 14 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธี

ที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 3.25, 4.75 และ 4.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 10.30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.30, 5.30 และ 5.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 25.30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงโมที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก ที่ 7, 14 และ 21 วันหลังราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. แล้วนำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของแตงโม เปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง พบว่า

ในวันที่ 7 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงโม ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบเมล็ดแตงโมที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดแตงโมที่ไม่งอก 70.50 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 14 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงโม ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 2.75, 3.25 และ 3.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 12.10 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงโม ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.75, 5.45 และ 5.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 27.50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมะระที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก ที่ 7, 14 และ 21 วันหลังราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. แล้วนำมาคิดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวของมะระ เปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธีการทดลอง พบว่า

ในวันที่ 7 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดมะระ ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบเมล็ดมะระที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดมะระที่ไม่งอก 70.50 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 14 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดมะระ ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 2.50, 3.50 และ 3.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 12.50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดมะระ ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 4.50, 5.10 และ 5.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 26.30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0

เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ทั้งหมดในการยับยั้งหรือลดจำนวนต้นเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวา แตงโม และมะระที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก หลังการทดลอง 21 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และ กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) เป็นกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพดี โดยกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.30, 5.75 และ 4.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.30, 5.45 และ 5.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.75, 5.50 และ 5.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 25.30, 27.50 และ 26.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor เป็นกรรมวิธีการยับยั้งหรือลดจำนวนต้นเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวา แตงโม และมะระ โดยไม่พบจำนวนต้นพืชตระกูลแตงทั้ง 3 ชนิด ที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือแสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 จำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระที่แสดงอาการเหี่ยวหรือเมล็ดไม่งอกที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากปลูกในดินที่มีเชื้อ *F. solani* แล้วราดดินด้วยเชื้อ *Bacillus* sp. ในสภาพแปลงปลูก

กรรมวิธี	จำนวนต้นแตงที่แสดงอาการเหี่ยวหรือเมล็ดไม่งอก[1/] (%)								
	7 DAI [2/]			14 DAI			21 DAI		
	แตงกวา	แตงโม	มะระ	แตงกวา	แตงโม	มะระ	แตงกวา	แตงโม	มะระ
ดินคลุก *F. solani* + BS1 (17G18)	0 a [3/]	0 a	0 a	3.25 b	2.75 b	2.50 b	5.30 b	5.75 b	4.50 b
ดินคลุก *F. solani* + BS2 (20W12)	0 a	0 a	0 a	10.30 c	12.10 c	12.50 c	25.30 c	27.50 c	26.30 c
ดินคลุก *F. solani* + BS3 (Trade 1)	0 a	0 a	0 a	4.75 b	3.25 b	3.50 b	5.30 b	5.45 b	5.10 b
ดินคลุก *F. solani* + BS4 (Trade 2)	0 a	0 a	0 a	4.10 b	3.10 b	3.75 b	5.75 b	5.50 b	5.30 b
ดินคลุก *F. solani* + น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	67.30 b	70.50b	68.10b	100 d	100 d	100 d	100 d	100 d	100 d
ดินไม่คลุก *F. solani* + ไม่ราด *B. subtilis*	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
ดินคลุก *F. solani* + ราดTerraclor	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
CV (%)	30.10	29.85	30.45	23.25	24.10	25.31	19.20	20.10	19.35

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 กระถาง

[2/] จำนวนวันหลังปลูกเชื้อ

[3/] ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต

กิจกรรมย่อยที่ 3.3 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.3.1การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. สาเหตุโรคยางไหล

ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลและการแยกเชื้อ

ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จากแหล่งปลูกแตงแคนตาลูปและแตงเมล่อนที่สำคัญของเกษตรกรใน จ.สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา โดยเก็บตัวอย่างต้นพืชที่แสดงอาการเป็นโรค นำมาแยกเชื้อโดยวิธี tissue transplanting method พบว่าสามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคจากอาการดังกล่าวได้ 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 1,2)

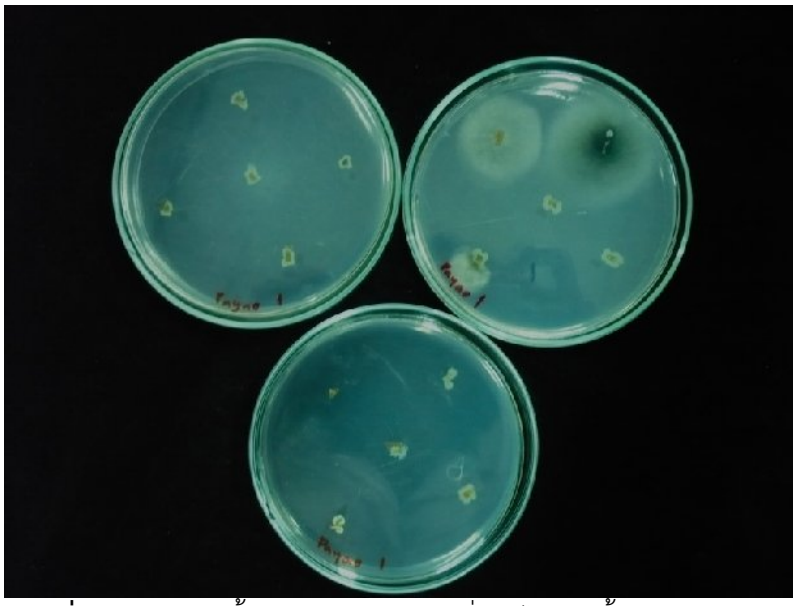
ภาพที่ 1 ลักษณะอาการโรคต้นแตกยางไหลในแตงแคนตาลูป

ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีเชื้อราสาเหตุโรค *D. bryoniae* ที่แยกได้

2. การแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ได้เก็บตัวอย่างต้น และ ใบแตงแคนตาลูปและแตงเมล่อนที่เป็นโรค และต้นที่ปกติจากแหล่งปลูกของเกษตรกร เพื่อนำมาแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี leaf washing technique และเก็บตัวอย่างดินมาแยกหาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์โดยวิธี Soil dilution plate โดยนำมาเลี้ยงบนอาหาร NGA และ PDA ผลการทดลองพบว่า สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท และแยก

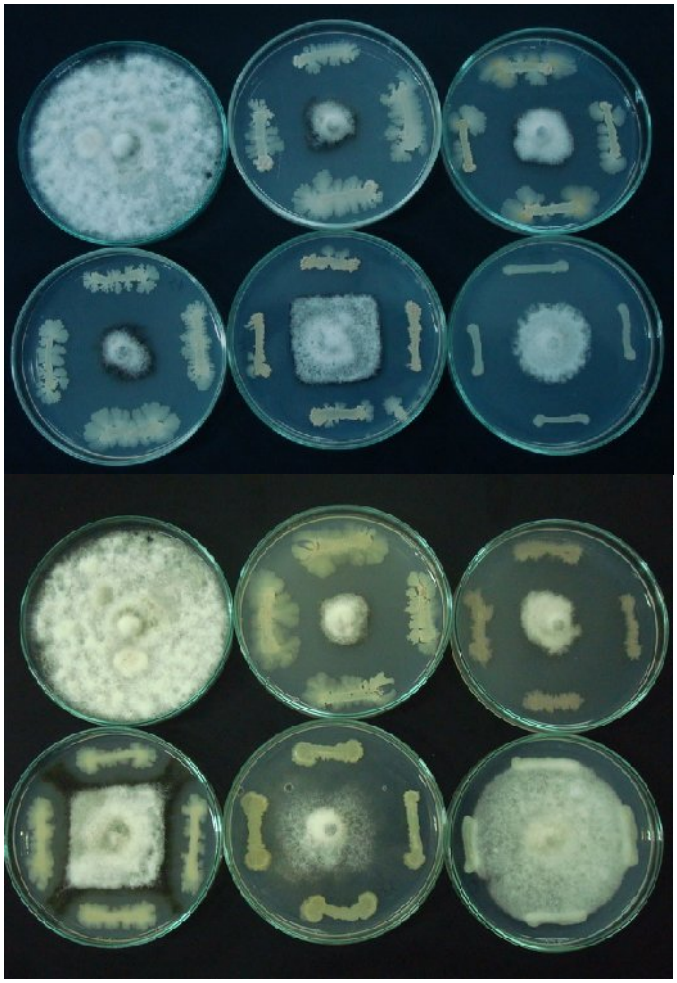
เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท (ภาพที่ 3) และแยกเชื้อเก็บไว้ให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



ภาพที่ 3 ลักษณะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากชิ้นส่วนพืช

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคยางไหลในห้องปฏิบัติการ

ในปี 2554 ได้ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection จำนวน 40 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท รวม 54 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทสระแก้ว ไอโซเลทสุพรรณบุรี ไอโซเลทพะเยา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยการวัดขนาดการสร้าง clear zone ที่กว้างของเชื้อแต่ละไอโซเลท และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท จากผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีทั้งหมด 34 ไอโซเลท และทำการคัดเลือกโดยแยกประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง clear zone ได้กว้างและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้ง 3 ไอโซเลท ซึ่งพบมีเพียง 2 ไอโซเลท คือ BSC07 และ BSC24 (ตารางที่ 1) กลุ่มที่ 2 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง clear zone ได้กว้างและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ 2 ไอโซเลท มี 14 ไอโซเลท คือ BSC04, BSC14, BSC16, BSC21, BSC23, BSC25, BSC27, BSC28, BSC32, BSC34, BSC39, BSC41, BSC49 และ BSC50 และกลุ่มที่ 3 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง clear zone ได้กว้างและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียง 1 ไอโซเลท มีทั้งหมด 18 ไอโซเลท คือ BSC03, BSC08, BSC10, BSC11, BSC13, BSC16, BSC20, BSC22, BSC23, BSC26, BSC35, BSC36, BSC38, BSC40, BSC49, BSC51 BSC52 และ BSC53 (ภาพที่ 4)ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถคัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 34 ไอโซเลท จากทั้งหมด 54 ไอโซเลท และได้เก็บเชื้อไว้ให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป



ภาพที่ 4 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2554

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSC 01	0.77	0.54	0.00
BSC 02	0.86	0.75	0.33
BSC 03	0.53	0.96*	0.59
BSC 04	0.71	0.97	0.95**
BSC 05	0.75	0.82	0.59
BSC 06	0.00	0.00	0.00
BSC 07	0.96	1.32	1.26***
BSC 08	0.82	0.93*	0.72
BSC 09	0.74	0.86	0.54
BSC 10	0.86	0.91*	0.66
BSC 11	1.07*	0.70	0.82
BSC 12	0.83	0.69	0.69
BSC 13	1.14*	0.49	0.62
BSC 14	0.00	1.11	1.01**
BSC 15	0.00	0.00	0.68

ตารางที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2554

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSC 16	1.13	0.92**	0.84
BSC 17	0.76	0.63	0.76
BSC 18	0.69	0.49	0.50
BSC 19	0.80	0.78	0.62
BSC 20	1.05*	0.75	0.73
BSC 21	0.70	1.06	1.26**
BSC 22	0.77	0.78	0.95*
BSC 23	0.96	0.82	1.13**
BSC 24	0.99	0.92	1.00***
BSC 25	1.10	0.93**	0.84
BSC 26	0.82	0.92*	0.78
BSC 27	1.11	0.74	1.13**
BSC 28	2.66	0.87	1.02**
BSC 29	0.79	0.77	0.56
BSC 30	0.88	0.75	0.65

ตารางที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2554

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSC 31	0.83	0.69	0.76
BSC 32	1.01	1.02**	0.60
BSC 33	0.84	0.74	0.80
BSC 34	1.02	0.96**	0.80
BSC 35	0.88	1.14*	0.73
BSC 36	0.93*	0.82	0.83
BSC 37	0.75	0.89	0.82
BSC 38	1.12*	0.78	0.89
BSC 39	1.09	0.93**	0.41
BSC 40	0.93*	0.74	0.81
BSC 41	1.00	0.97**	0.49
BSC 42	0.85	0.88	0.77
BSC 43	0.66	0.89	0.74
BSC 44	0.60	0.78	0.62
BSC 45	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2554

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSC 46	0.65	0.63	0.66
BSC 47	0.61	0.74	0.70
BSC 48	0.77	0.85	0.66
BSC 49	0.95	0.86	0.93**
BSC 50	0.94	0.90**	0.70
BSC 51	0.89	0.92*	0.73
BSC 52	1.02*	0.61	0.60
BSC 53	0.90*	0.87	0.58
BSC 54	0.89	0.77	0.86

หมายเหตุ : * = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 1 ไอโซเลท
** = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 2 ไอโซเลท
*** = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 3 ไอโซเลท

ในปี 2555 ได้ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญเส้นใยเชื้อรา *D. bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล จำนวน 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลทสระแก้ว ไอโซเลทสุพรรณบุรี ไอโซเลทพะเยา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ซึ่งได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยการวัดขนาดการสร้าง clear zone ที่กว้างของเชื้อแต่ละไอโซเลท และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท จากผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีทั้งหมด 34 ไอโซเลท และทำการคัดเลือกโดยแยกประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง clear zone ได้กว้างและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ทั้ง 3 ไอโซเลท มีทั้งหมด 12 ไอโซเลท คือ BSS01, BSS27, BSS29, BSS32, BSS37, BSS55, BSS58, BSS64, BSS65, BSS69, BSS75 และ BSS77 (ตารางที่ 2) กลุ่มที่ 2 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง clear zone ได้กว้างและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้ 2 ไอโซเลท มีทั้งหมด 25 ไอโซเลท คือ BSS04, BSS05, BSS08, BSS15, BSS16, BSS21, BSS30, BSS31, BSS34, BSS35, BSS36, BSS41, BSS43, BSS44, BSS50, BSS51, BSS52, BSS53, BSS56, BSS61, BSS62, BSS66, BSS71, BSS74, และ BSS79 (ตารางที่ 2) และกลุ่มที่ 3 คือ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถสร้าง clear zone ได้กว้างและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคได้เพียง 1 ไอโซเลท มีทั้งหมด 27 ไอโซเลท คือ BSS02, BSS03, BSS06, BSS09, BSS12, BSS18, BSS20, BSS22, BSS23, BSS24, BSS38, BSS39, BSS45, BSS46, BSS47, BSS48, BSS49, BSS54, BSS57, BSS60, BSS67, BSS68, BSS70, BSS72, BSS76, BSS78 และ BSS80 (ตารางที่ 2) ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถคัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 64 ไอโซเลท จากทั้งหมด 80 ไอโซเลท และได้เก็บเชื้อไว้ให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

ตารางที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSS 01	1.46	1.39	1.71***
BSS 02	0.77	0.86	1.39*
BSS 03	0.66	0.78	1.39*
BSS 04	1.10	0.93	1.50**
BSS 05	0.82	1.47	1.64**
BSS 06	0.65	0.78	1.22*
BSS 07	1.17	1.15**	0.42
BSS 08	0.68	1.19	1.31**
BSS 09	1.18*	0.00	0.74
BSS 10	0.19	0.00	0.00
BSS 11	0.00	0.00	0.00
BSS 12	0.61	0.70	1.35*
BSS 13	0.15	0.00	0.10
BSS 14	0.24	0.00	0.17
BSS 15	0.95	1.08	1.51**

ตารางที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSS 16	0.76	1.35	1.34**
BSS 17	0.87	0.61	0.72
BSS 18	0.71	0.99	1.16*
BSS 19	0.61	0.74	0.86
BSS 20	0.80	0.58	1.06*
BSS 21	0.81	1.08	1.05**
BSS 22	0.91	0.75	1.19*
BSS 23	1.02*	0.77	0.97
BSS 24	0.84	0.86	1.03*
BSS 25	0.60	0.78	0.81
BSS 26	0.00	0.00	0.00
BSS 27	1.11	1.94	1.86***
BSS 28	0.40	0.00	0.33
BSS 29	1.12	1.43	1.93***
BSS 30	2.13	0.93	1.94**

ตารางที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSS 31	0.96	1.25	1.68**
BSS 32	1.08	1.54	1.63***
BSS 33	0.00	0.00	0.00
BSS 34	0.74	1.25	1.02**
BSS 35	1.68	0.99	1.57**
BSS 36	0.87	1.27	1.28**
BSS 37	1.09	1.13	1.15***
BSS 38	0.74	1.38*	0.96
BSS 39	0.58	0.75	1.04*
BSS 40	0.53	0.73	0.93
BSS 41	1.27	0.93	1.08**
BSS 42	1.26	1.00**	0.72
BSS 43	1.15	0.51	1.04**
BSS 44	1.41	0.76	1.35**
BSS 45	1.53*	0.00	0.79

ตารางที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSS 46	1.64*	0.80	0.90
BSS 47	1.17*	0.76	0.80
BSS 48	1.63*	0.70	0.96
BSS 49	1.81*	0.00	0.41
BSS 50	1.48	0.65	1.24**
BSS 51	1.42	0.76	1.21**
BSS 52	1.41	0.91	1.23**
BSS 53	1.53	0.90	1.34**
BSS 54	1.28*	0.97	0.99
BSS 55	1.35	1.06	1.23***
BSS 56	1.25	1.15**	0.95
BSS 57	1.06*	0.96	0.80
BSS 58	2.18	1.41	1.09***
BSS 59	0.00	0.00	0.11
BSS 60	1.35*	0.00	0.29

ตารางที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSS 61	1.54	0.00	1.34**
BSS 62	1.24	1.25**	0.96
BSS 63	0.92	0.00	0.87
BSS 64	1.18	1.29	1.27***
BSS 65	1.43	1.00	1.55***
BSS 66	0.88	1.17	1.18**
BSS 67	0.60	0.00	1.26*
BSS 68	1.08*	0.00	0.00
BSS 69	1.10	1.09	1.05***
BSS 70	0.93	1.00*	0.92
BSS 71	1.24	0.00	1.31**
BSS 72	1.09*	0.00	0.15
BSS 73	0.00	0.00	0.00
BSS 74	1.43	0.76	1.17**
BSS 75	1.07	1.12	1.66***

ตารางที่ 2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *Didymella bryoniae* ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSS 76	0.89	0.97	2.01*
BSS 77	1.38	1.46	1.47***
BSS 78	0.88	1.19*	1.10
BSS 79	1.31	0.78	1.60**
BSS 80	0.96	0.78	1.23*

หมายเหตุ : * = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 1 ไอโซเลท
** = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 2 ไอโซเลท
*** = เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ 3 ไอโซเลท

เนื่องจากในการคัดเลือกครั้งนี้มีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคในปี 2554 จำนวน 34 ไอโซเลท และในปี 2555 จำนวน 64 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 98 ไอโซเลท ซึ่งในการคัดเลือกเพื่อนำไปใช้ในสภาพโรงเรือนทดลองมีจำนวนมากเกินไป จึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อคัดเลือกให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ดังนั้นจึงได้นำเอาเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 ที่สามารถยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท จำนวน 14 ไอโซเลท มาทดสอบอีกครั้งเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ดังกล่าวก่อนนำไปทดสอบในสภาพโรงเรือนทดลองต่อไป (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์กลุ่มที่ 1 จำนวน 14 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรค *D. bryoniae* ทั้ง 3 ไอโซเลท ทำการทดลองปี 2555

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์	ขนาด clear zone ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค (ซ.ม.)		
	ไอโซเลทสระแก้ว	ไอโซเลทสุพรรณบุรี	ไอโซเลทพะเยา
BSC 07	1.12*	0.83	0.69
BSC 24	0.84	0.78	0.77
BSS 01	1.44	1.33	1.11***
BSS 27	1.71	1.01**	0.96
BSS 29	1.11	0.68	1.14**
BSS 32	1.46*	0.91	0.88
BSS 37	1.64	0.82	1.43**
BSS 55	1.35	0.84	1.01**
BSS 58	1.81	1.21	1.14***
BSS 64	1.51	1.21**	0.96
BSS 65	1.65	1.48	1.32***
BSS 69	1.21*	0.67	0.73
BSS 75	1.20	0.86	1.85**
BSS 77	1.26*	0.86	0.92

การทดลองที่ 3.3.2 การคัดเลือกและทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุม เชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดลอง

1.การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Dydimella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลองที่ 1 (ตารางที่ 1)

ดำเนินการทดลองในแปลงปลูกแตงเมล่อนเกษตรกรที่ อ.หนองหญ้าไซ จ.สุพรรณบุรี ในช่วงเดือนมกราคม - มีนาคม 2558 ตามกรรมวิธีที่วางไว้โดยเตรียมแปลงทดลองขนาด 2 x 5 เมตร จำนวน 20 แปลงทดลองย่อย สำรวจการเกิดโรคทุก 7 วัน เมื่อเริ่มพบอาการของโรคที่บริเวณโคนต้น จึงทำการประเมินการเกิดโรคในแปลงทุกครั้งก่อนใส่เชื้อปฏิปักษ์ และหลังใส่เชื้อปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย โดยใส่เชื้อลงดินสลับการพ่นเชื้อที่ต้นในแต่ละกรรมวิธี ทุก 7 วัน ทั้งหมด 4 ครั้ง ผลการทดลอง พบว่า

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 1 ก่อนการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทจำนวน 3 กรัมลงในดิน พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลระหว่าง 1.00 - 1.12

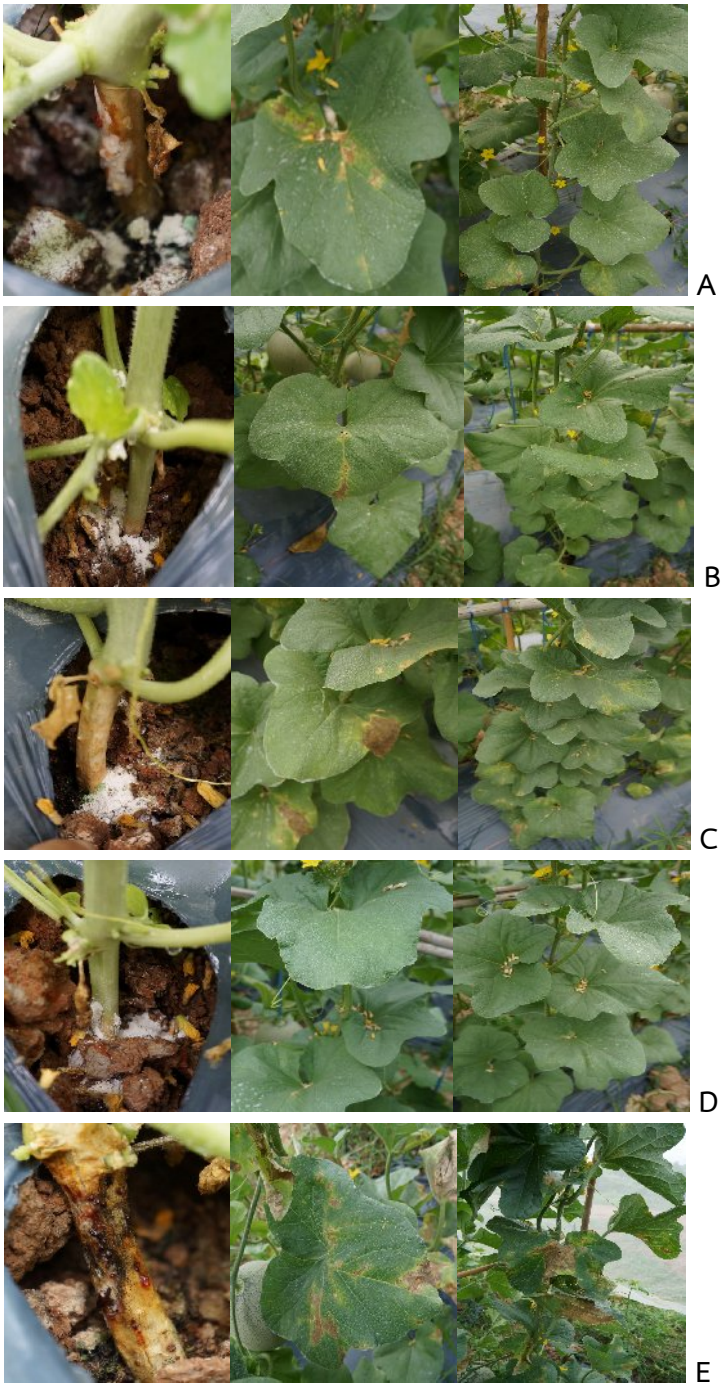
ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 2 ก่อนการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทอัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS65 และ BSS32 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุดเท่ากับ 1.06 และ 1.08 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ไอโซเลท BSS37 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 1.35 และ1.31 และทั้ง 2 ไอโซเลทก็ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 1.50

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 3 ก่อนการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทจำนวน 3 กรัมลงในดินครั้งที่ 2 พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างแต่ละไอโซเลท และไอโซเลทBSS65 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุดเท่ากับ 1.17 รองลงมาได้แก่ไอโซเลท BSS32, BSS37 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 1.24, 1.35 และ 1.52 ตามลำดับ ซึ่งทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.20

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 4 ก่อนการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทอัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในระหว่างแต่ละไอโซเลท และพบว่าไอโซเลทที่มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุด ได้แก่ ไอโซเลท BSS32 และ BSS37 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 1.42 และ 1.62 รองลงมาได้แก่ไอโซเลท BSS65 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.12 และ 2.29 ซึ่งทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.72

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 5 ที่ 7 วันหลังการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย พบว่า ไอโซเลทที่มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุด ได้แก่ ไอโซเลท BSS32 ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค เท่ากับ 1.96 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BSS37, BSS065 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.80, 2.56 และ 2.41 ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ

กรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 3.05 ยกเว้นในไอโซเลท BSS37 ที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์



ภาพที่ 1 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคยางไหลแตงเมล่อน แปลงที่ 1 อ.หนองหญ้าไซ จ.สุพรรณบุรี A : ไอโซเลท BSS32, B : ไอโซเลท BSS37, C: ไอโซเลท BSS65, D : ไอโซเลท A013, E : ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

2.การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Dydimella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลองที่ 2 (ตารางที่ 2)

ดำเนินการทดลองในแปลงปลูกแตงเมล่อนเกษตรกรที่ อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี ในช่วงเดือนมิถุนายน – สิงหาคม 2558 ตามกรรมวิธีที่วางไว้โดยเตรียมแปลงทดลองขนาด 2 x 5 เมตร จำนวน 20 แปลงทดลองย่อย สำรวจการเกิดโรคทุก 7 วัน เมื่อเริ่มพบอาการของโรคที่บริเวณโคนต้น จึงทำการประเมินการเกิดโรคในแปลงทุกครั้งก่อนใส่เชื้อปฏิปักษ์ และหลังใส่เชื้อปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย โดยใส่เชื้อลงดินสลับการพ่นเชื้อที่ต้นในแต่ละกรรมวิธี ทุก 7 วัน ทั้งหมด 4 ครั้ง ผลการทดลอง พบว่า

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 1 ก่อนการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทจำนวน 3 กรัมลงในดิน พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลระหว่าง 1.11 - 1.30

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 2 ก่อนการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทอัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS32 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุดเท่ากับ 1.91 และ 1.96 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ไอโซเลท BSS37 และ BSS65 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.07 และ 2.05 และทั้ง 2 ไอโซเลทก็ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ กับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.25

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 3 ก่อนการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทจำนวน 3 กรัมลงในดินครั้งที่ 2 พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS32, BSS37, BSS65 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.09, 2.13, 2.10 และ 2.19 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกรรมวิธี แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.50

ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 4 ก่อนการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทอัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS65 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุดเท่ากับ 2.32 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ ไอโซเลท BSS32, BSS37 และ BSS65 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.74, 2.40 และ 2.38 ตามลำดับ แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.85

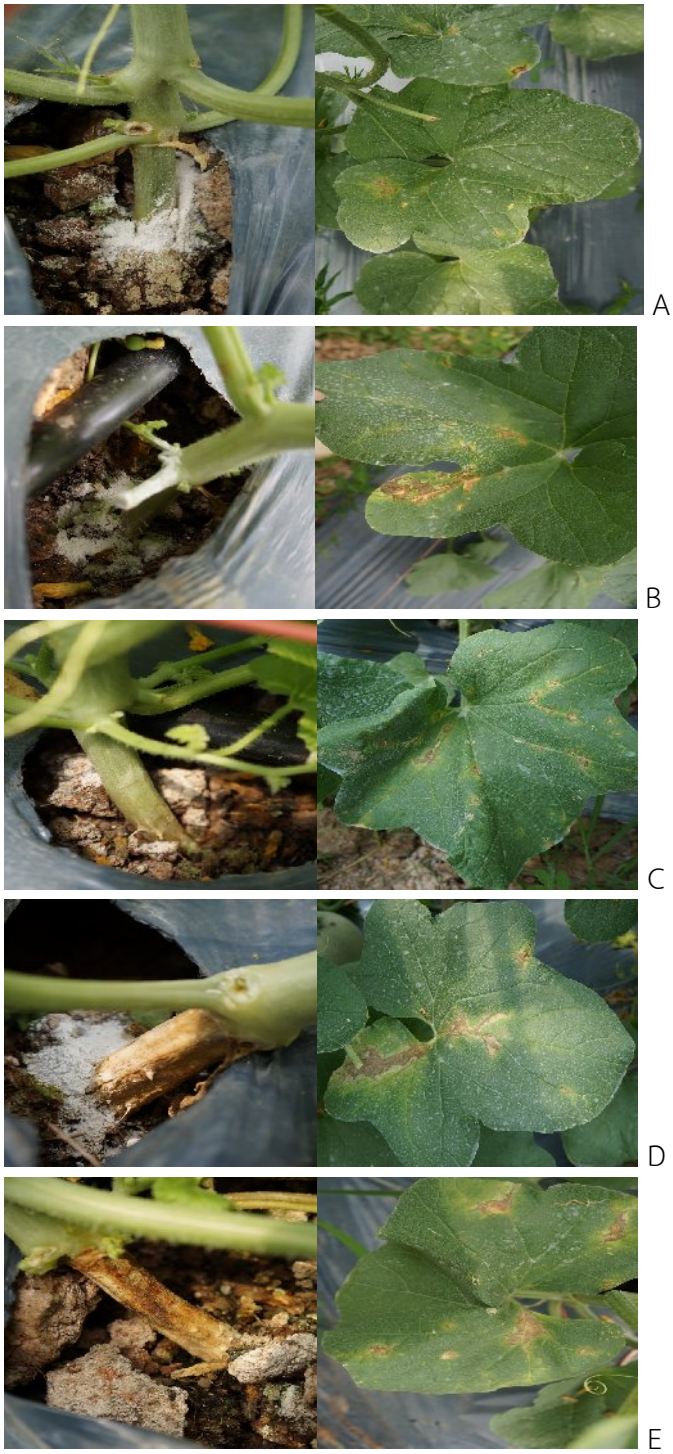
ในการประเมินความรุนแรงของโรคครั้งที่ 5 ที่ 7 วันหลังการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย พบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS32, BSS37, BSS65 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหล เท่ากับ 2.09, 2.13, 2.10 และ 2.19 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกรรมวิธี แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 3.09

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผลผลิตและน้ำหนักรวมของผลผลิตของทั้งสองแปลงทดลองพบว่า ในแปลงทดลองที่ 1 ที่ทำการทดลองที่แปลงเกษตรกร อ. หนองหญ้าไซ จ. สุพรรณบุรี ช่วงเดือน มกราคมถึงเดือนมีนาคม 2558 ซึ่งในระหว่างทำการทดลองพบว่า แปลงทดลองและแปลงเกษตรกรประสบปัญหาเพลี้ยไฟระบาดในระยะย้ายกล้า ทำให้ต้นพืชทดลองมีการเจริญเติบโตไม่ดี ต้นแคระแกรน และบางต้นมีอาการของโรคไวรัสร่วมด้วยในจำนวนต้นที่ได้สุ่มทำการทดลอง จำนวน 10 ต้นต่อซ้ำ ซึ่งได้ดำเนินการป้องกันกำจัดแมลงและทำการทดลองต่อ ดังนั้น สภาพพืชทดลองในแปลงนี้จึงไม่ค่อยสมบูรณ์ แต่ก็พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มี

การใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตารางที่ 1) เมื่อพิจารณาจำนวนผลผลิตและน้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ในแปลงทดลองที่ 1 พบว่า ไอโซเลท AS013 มีจำนวนผลผลิตที่ได้สูงสุดคือ 38 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้สูงสุดคือ 50.15 กิโลกรัม รองลงมาคือ ไอโซเลท BSS37 จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 34 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 40.25 กิโลกรัม ไอโซเลท BSS65 จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 31 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 36.50 กิโลกรัม ส่วนไอโซเลทBSS32 จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 29 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 39.30 กิโลกรัม (ตารางที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ในทุกกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ นอกจากจะสามารถควบคุมโรคได้ดีไม่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท แต่พบว่าในบางไอโซเลทนั้น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถควบคุมโรคและส่งเสริมให้ต้นพืชเจริญได้ดี มีจำนวนผลผลิต และน้ำหนักผลผลิตรวมที่ดีด้วย จากการทดลองนี้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท AS013 เป็นไอโซเลทที่ได้จำนวนผลและผลผลิตรวมสูงที่สุด ส่วนไอโซเลท BSS32 แม้จะได้จำนวนผลผลิตน้อยแต่พบว่า น้ำหนักผลผลิตรวมก็ดีไม่ต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า มีจำนวนผลผลิตที่ได้คือ 26 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 29.20 กิโลกรัม ซึ่งผลผลิตที่ได้มีความแตกต่างทั้งเรื่องของปริมาณและคุณภาพแตงเมล่อน

ในการเปรียบเทียบกับผลการทดลองในแปลงที่ 2 อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี ในระหว่างเดือน มิถุนายน ถึงเดือนสิงหาคม 2558 ซึ่งสภาพแปลงทดลองและพืชทดลองมีการเจริญที่เป็นปกติ พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาจำนวนผลผลิตและน้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ในแปลงทดลองที่ 2 พบว่า ไอโซเลท BSS32 มีจำนวนผลผลิตที่ได้สูงสุดคือ 40 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้สูงสุดคือ 64.90 กิโลกรัม รองลงมาคือ ไอโซเลท AS013 จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 40 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 63.33 กิโลกรัม และไอโซเลท BSS37 จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 40 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 60.51 กิโลกรัม ส่วนไอโซเลท BSS65 จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 39 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 59.90 กิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่า จำนวนผลผลิตที่ได้คือ 37 ลูก และ น้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้ คือ 54.80 กิโลกรัม (ตารางที่ 4)

ซึ่งจากผลการทดลองนี้ พบว่ามีความสอดคล้องกันกับแปลงทดลองที่1 คือการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงในดินและพ่นสลับบนใบและต้นแตงเมล่อนนั้น ทุกไอโซเลทสามารถควบคุมโรคได้ดีไม่แตกต่างกัน และสามารถเพิ่มน้ำหนักผลผลิตแตงเมล่อนได้ เนื่องจากการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงดินเป็นการควบคุมปริมาณเชื้อในดินเพื่อลดการเข้าทำลายที่บริเวณโคนต้น และเมื่อมีการพ่นสลับที่ใบและต้น ก็สามารถควบคุมการเกิดโรคที่กิ่งก้านและใบ ทำให้พืชแข็งแรงสมบูรณ์ และทำให้ผลแตงเมล่อนมีคุณภาพและได้น้ำหนักผลผลิตดี



ภาพที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคยางไหลแตงเมล่อน แปลงที่ 1 อ. เมือง จ.สุพรรณบุรี A : ไอโซเลท BSS32, B : ไอโซเลท BSS37, C: ไอโซเลท BSS65, D : ไอโซเลท A013, E : ไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ตารางที่ 1 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Dydimella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลแตงเมล่อน ในแปลงทดลองที่ 1 อ.หนองหญ้าไซ จ.สุพรรณบุรี

กรรมวิธี/ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคก่อนการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่4	หลังใส่เชื้อครั้งที่ 4
BSS32	**1.04**[ns]	**1.08a**[1/]	**1.24a**	**1.42a**	1.96a
BSS37	**1.00**	**1.35ab**	**1.35a**	**1.62a**	2.80ab
BSS65	**1.00**	**1.06a**	**1.17a**	**2.12a**	2.56a
AS013	**1.03**	**1.31ab**	**1.52a**	**2.29a**	2.41a
control	**1.12**	**1.50b**	**2.20b**	**2.72b**	3.05b
CV (%)	**6.76**	**20.60**	**18.57**	**32.38**	30.23

หมายเหตุ : 1/ = ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น99% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนผลผลิตและน้ำหนักผลิตรวมที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในแปลงทดลองที่ 1 อ.หนองหญ้าไซ จ. สุพรรณบุรี

กรรมวิธี	**จำนวน (ลูก)** [1/]	**น้ำหนักผลผลิตรวม (ก.ก.)**
BSS32	29	39.30
BSS37	34	40.25
BSS65	31	36.50
AS013	38	50.15
control	26	29.20

หมายเหตุ : 1/ = เก็บผลผลิตจากพืชทดลอง จำนวน 10 ต้นต่อซ้ำ จำนวน 4 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

ตารางที่ 3 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Dydimella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหล ในแปลงทดลองที่ 2 อ.เมือง จ.สุพรรณบุรี

กรรมวิธี/ไอโซเลท	ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคก่อนการพ่นเชื้อ				
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่4	หลังใส่เชื้อครั้งที่ 4
BSS32	**1.12**[ns]	**1.91a**[1/]	**2.09a**	**2.74ab**	2.76a
BSS37	**1.20**	**2.07ab**	**2.13a**	**2.40ab**	2.62a
BSS65	**1.11**	**2.05ab**	**2.10a**	**2.32a**	2.38a
AS013	**1.26**	**1.96a**	**2.19a**	**2.38ab**	2.55a
control	**1.30**	**2.25b**	**2.50b**	**2.85b**	3.09b
CV (%)	**8.56**	**7.43**	**13.18**	**8.00**	10.52

หมายเหตุ : 1/ ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนผลผลิตและน้ำหนักผลิตรวมที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในแปลงทดลองที่ 2 อ.เมือง จ. สุพรรณบุรี

กรรมวิธี	จำนวน (ลูก) 1/	น้ำหนักผลผลิตรวม (ก.ก.)
BSS32	40	64.90
BSS37	40	60.51
BSS65	39	59.90
AS013	40	63.33
control	37	54.80

หมายเหตุ : 1/ = เก็บผลผลิตจากพืชทดลอง จำนวน 10 ต้นต่อซ้ำ จำนวน 4 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี

การทดลองที่ 3.3.3 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้

ผลการทดลอง

1. การแยกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ในห้องปฏิบัติการ

ผลการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุปลูก ราก ใบ และดอกของกล้วยไม้ที่เก็บมาจากแปลงกล้วยไม้ของเกษตรกรจังหวัดนนทบุรี ปทุมธานี นครปฐม สมุทรสงคราม และกาญจนบุรี พบว่าสามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 30 ไอโซเลท นำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้ทั้งหมดและจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา รวม 236 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จำนวน 27 ไอโซเลท เป็นเชื้อที่แยกได้จากกล้วยไม้จำนวน 1 ไอโซเลท และเป็นเชื้อจาก culture collection ของกลุ่มงานบักเตรีวิทยา จำนวน 26 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ได้ดี จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อทดสอบในสภาพเรือนทดลอง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลอง

ดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้เพื่อใช้ควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลอง โดยปลูกเชื้อ *B. gladioli* บนกล้วยไม้ และเริ่มพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์หลังจากกล้วยไม้เริ่มแสดงอาการของโรค พ่นทุก 7 วัน จำนวน 5 ครั้ง พบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้ดี มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างจากกรรมวิธีพ่นด้วยน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในเรือนทดลองแล้วจะนำไปทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกรต่อไป

3. การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

การจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 โดยทำการศึกษาลักษณะรูปร่างทางสรีรวิทยาของเชื้อ ทดสอบแกรม การสร้างสปอร์และการย้อมติดสี Malachite green และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิด พบว่าเชื้อแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท มีโคโลนีสีขาวครีม เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์รูปวงรี เจริญในสภาพที่มีอากาศ (aerobe) สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือ NaCl 10% เชื้อให้ผลบวกกับการทดสอบ Catalase, Gelatin hydrolysis, Nitrate reduction และ Starch hydrolysis แต่เชื้อไม่สามารถสร้าง Indole, H_2S, Arginine dihydrolase และ Ornithine decarboxylase ได้ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* (ตารางที่ 2)

ในประเทศไทยมีรายงานการนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ควบคุมโรคพืชในไม้ดอกไม่มากนัก เสมอใจ และคณะ (2551) ทำการศึกษาเพื่อหาแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุม *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* เชื้อสาเหตุโรคใบไหม้ของหน้าวัว โดยแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุปลูกหน้าวัว ใบหน้าวัวที่เป็นโรคและใบปกติ จำแนกเชื้อได้เป็น *B. subtilis* ทำการทดสอบการควบคุมโรคใบไหม้กับหน้าวัวสายพันธุ์ Casino และ Tropical โดยการพ่นแต่ละกลุ่มของ B1228, B1317 และ B1348 ในเรือนทดลอง ผลการทดลองพบว่า การใช้เชื้อผสม 3 ชนิด มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูงสามารถลดการเกิดโรคได้ 81-89% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม สำหรับในกล้วยไม้ ปิยรัตน์ และคณะ (2553) ทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* บนกล้วยไม้สกุลแวนด้าลูกผสมอายุ 4 เดือน โดยพ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ NA18, KA28, KA33, KA34, KA35 และชีวภัณฑ์ผงอัดเม็ดฟู่ของแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA33 เปรียบเทียบกับการพ่นน้ำเปล่า ผลการทดสอบหลังจากพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ควบคุมโรคตามกรรมวิธี 5 ครั้ง พบว่าทุกกรรมวิธีให้ผลในการควบคุมโรคได้ดีกว่าการพ่นด้วยน้ำเปล่า โดยกรรมวิธีการพ่นเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA28 กล้วยไม้แสดงอาการโรคต่ำสุด รองลงมาคือ เซลล์แขวนลอยแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท KA33 กรรมวิธีการพ่นชีวภัณฑ์แบคทีเรียไอโซเลท KA33 ให้ผลในการควบคุมโรคใกล้เคียงกับการพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท KA34 และ KA35 และในปี 2555 สุรีย์พร และคณะ ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collections และแยกเก็บจากบริเวณผิวใบของกล้วยไม้จังหวัดกาญจนบุรีเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละ *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) และ *E. chrysanthemi* (Ech) แล้วทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดในสภาพโรงเรือน พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วนไอโซเลต 17G18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ โดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลต BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc (สุรีย์พร และ คณะ, 2555) และยังไม่มีรายงานการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์มาใช้ในการควบคุมโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อ *B. gladioli*

ตารางที่ 1 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้

กรรมวิธี	ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรค						
	ก่อนพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์					7 วันหลังพ่น	14 วันหลังพ่น
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 5	ครั้งที่ 5
1. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS3	1.03	1.14	1.64	2.26 ab[1/]	3.22 b	3.22 bc	4.43 bcd
2. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5	1.02	1.34	1.47	1.71 a	2.14 ab	2.20 ab	2.90 ab
3. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS6	1.01	1.18	1.72	2.22 ab	3.38 b	3.39 bc	4.76 cd
4. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS23	1.03	1.22	1.64	2.06 ab	2.30 ab	2.30 abc	3.03 abc
5. พ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS40	1.02	1.19	1.54	1.74 a	2.37 ab	2.37 abc	3.22 abc
6. พ่นด้วยสารป้องกันกำจัดโรคพืช thiram 80% WG	1.06	1.13	1.36	1.65 a	1.70 a	1.70 a	2.26 a
7. พ่นด้วยน้ำเปล่า	1.01	1.30	1.84	2.71 b	3.34 b	3.54 c	4.99 d
CV (%)	3.9	14.9	27.8	27.0	29.6	29.8	30.4

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในสดมภ์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

คุณสมบัติที่ใช้ทดสอบ	เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์			
	Bacillus subtilis[1/]	BS5	BS23	BS40
Gram staining	+	+	+	+
Endospore	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	-	-
Mobility test	+	+	+	+
Catalase reaction	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+
Growth in 10% NaCl	+	+	+	+
Indole production	nd	-	-	-
H_2S production	nd	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-

[1/] ข้อมูลจาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three (2009),

nd คือ ไม่มีข้อมูล, เครื่องหมาย + คือ เกิดปฏิกิริยาเป็นบวก, เครื่องหมาย - คือ เกิดปฏิกิริยาเป็นลบ

การทดลองที่ 3.3.4 การควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากวัสดุปลูก และส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ ได้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 40 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้ง 40 ไอโซเลท ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* สาเหตุโรคใบจุดสีน้ำตาลในห้องปฏิบัติการ พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* จำนวน 5 ไอโซเลท คือ 1.) BVN-5 2.) BVN-9 3.) BVR-37 4.) BVS-43 และ 5.) BVB-2 จึงนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 5 ไอโซเลทดังกล่าว ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ ในสภาพเรือนปลูกพืชทดลอง ซึ่งได้ทำการทดสอบในกล้วยไม้สกุลแวนดา วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำๆ ละ 15 กระถาง ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BVB-2, BVS-43 และ BVR-37 เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใบจุดสีน้ำตาลมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีใช้สารเคมี thiram 80% WG อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร และกรรมวิธีที่ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) (ผลการทดลองตารางที่ 1) เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในสภาพเรือนทดลองทั้ง 3 ไอโซเลท ทดสอบแกรม พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียติดสีแกรมบวกทั้ง 3 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการสร้างสปอร์ พบว่าสปอร์อยู่บริเวณกลางเซลล์ทั้ง 3 ไอโซเลท และตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป api 50 CHB ผลการทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* (ผลการทดลองตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในเรือนปลูกพืชทดลอง

กรรมวิธี	ระดับความรุนแรงของการเกิดโรค
กรรมวิธีที่ 1 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BVN-5	4.535 cd [1/]
กรรมวิธีที่ 2 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BVN-9	4.635 cd
กรรมวิธีที่ 3 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BVR-37	3.468 b
กรรมวิธีที่ 4 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BVS-43	3.250 ab
กรรมวิธีที่ 5 ปลูกเชื้อและใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BVB-2	3.100 a
กรรมวิธีที่ 6 ปลูกเชื้อและใช้สารเคมี thiram 80% WG อัตรา 20 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร	4.315 c
กรรมวิธีที่ 7 ปลูกเชื้อและใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม)	4.683 d
CV (%)	2.080

[1/] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ปรากฏอยู่ในแต่ละคอลัมน์แตกต่างกัน หมายถึง ข้อมูลดังกล่าวมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธีDuncan’s New Multiple Range Test (DMRT)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและการตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป api 50 CHB ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

ไอโซเลท	การทดสอบแกรม	ทดสอบการสร้างสปอร์	ตรวจด้วยชุดตรวจ api 50 CHB
BVR-37	บวก	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*
BVS-43	บวก	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*
BVB-2	บวก	สปอร์อยู่กลางเซลล์	*Bacillus subtilis*

การทดลองที่ 3.3.5การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ Rhizoctonia solani โดยชีววิธี

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา*R. solani* ในแปลงทดลอง

<u>แปลงทดลองที่ 1</u> การคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ในสภาพแปลงทดลอง

เมื่อข้าวโพดทดสอบอายุ 21 วัน ทำการปลูกเชื้อ *R. solani* ที่ได้เตรียมไว้โดยวิธีหยอดยอด จากนั้นทำการทดสอบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 7 ชนิดในการควบคุมเชื้อรา *R. solani* ในแปลงทดลอง โดยมีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 4 ครั้ง ประเมินการเกิดโรคก่อนพ่นทุกครั้ง โดยครั้งแรกเริ่มประเมินก่อนพ่นครั้งที่ 2 7 วัน ครั้งต่อไปก่อนการพ่นทุกครั้ง และหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน จากการประเมินหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน พบจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท คือ 20 W 7, 14 W 8 และ XM 40 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 29.86, 30.60 และ 30.82 กรรมวิธีพ่นน้ำเปล่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 34.03 นำจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทไปทดสอบเพิ่มเติมโดยเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาพ่นเป็นทุก 5 วัน (table 1)

<u>แปลงทดลองที่ 2</u> การทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

จากการประเมินหลังพ่นครั้งสุดท้าย 5 วัน พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 20 W 7 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 20.17 ไม่แตกต่างทางสถิติกับไอโซเลท 14 W 8 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร และ ไอโซเลท 14 W 8 อัตรา 80 กรัม/ 20 ลิตร และสารเปรียบเทียบ pyraclostrobin 25% W/V อัตรา 15 มล./ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 21.80, 22.77 และ 27.68 ตามลำดับ แต่ไอโซเลท 20 W 7 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร ไอโซเลท 14 W 8 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร และ ไอโซเลท 14 W 8 อัตรา 80 กรัม/ 20 ลิตร แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 35.00 กรรมวิธีพ่นสารเปรียบเทียบ pyraclostrobin 25% W/V อัตรา 15 มล./ 20 ลิตร ไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า (table 2)

จากผลการทดลองในตารางที่ 1 ได้คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงโรคต่ำที่สุดจำนวน 3 ไอโซเลทมาทดสอบโดยเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาของการพ่นจาก 7 วันเป็น 5 วัน พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ไอโซเลท 20 W 7 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *R. solani* ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับพากเพียร และ คณะ (2544) ได้ทดสอบ เชื้อ *B. subtilis* ซึ่งได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สูตรเหลว (TRF สูตร A และ TRF สูตร B) ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (*Rhizoctonia solani* Khun.) ในสภาพแปลง พบว่า การใช้ TRF สูตร A, TRF สูตร B, Larminar WP, Agroguard Liq. มีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 50.48, 52.53, 54.59 และ 55.18 ตามลำดับ ต่ำกว่ากรรมวิธีเปรียบเทียบซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ความรุนแรงของโรค 65.46% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 1 Antagonists efficacy test for banded leaf and sheath blight causes by *Rhizoctonia solani* on farm in Chiangmai province .

treatments	rate / 20 litres (g.)	Disease incidence (%)			
		1	2	3	4
1. XM 40	50	1.76	3.98	16.03	30.82
2. 14 G 12	50	1.80	5.88	22.01	35.87
3. 18 G 6	50	1.99	4.75	18.37	32.26
4. Cb7	50	2..24	5.82	21.76	33.58
5. 14 W 8	50	1.98	4.88	19.67	30.60
6. 11 W 12	50	2.26	5.66	20.95	32.36
7. 20 W 7	50	1.71	3.86	16.81	29.86
8. untreated	-	2.21	5.97	18.81	34.03
c.v.(%)		20.07	42.29	21.97	15.19

Table 2 Antagonists efficacy test for banded leaf and sheath blight causes by *Rhizoctonia solani* on farm in Nakornratchasima province.

treatments	rate / 20 litres (g./ml.)	Disease incidence (%)	
		1	2
1. XM 40	60	11.60	31.94 bc
2. XM 40	80	13.49	34.81 c
3. 14 W 8	60	7.09	21.80 ab
4. 14 W 8	80	8.38	22.77 ab
5. 20 W 7	60	7.94	20.17 a
6. 20 W 7	80	8.90	32.53 bc
7. pyraclostrobin 25% W/V	15	11.83	27.68 abc
8. untreated	-	10.86	35.00 c
c.v.(%)		31.69	27.74

กิจกรรมย่อยที่ 3.4 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช

การทดลองที่ 3.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp

ปีงบประมาณ 2554–2555 ตรวจพบแบคทีเรีย *P. penetrans* ในตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้จาก หัวมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* cv. Atlantic) มันขี้หนู (*Coleus parvifolius*) และรากพริก (*Capsicum annuum*) (ตารางที่ 1) และสามารถเพิ่มจำนวนสปอร์สำหรับใช้ในการทดลองได้บางไอโซเลต

ปีงบประมาณ 2556 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* 2 ไอโซเลตที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง (PP122) และพริก (PPR70) อย่างละ 1 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับการใช้สาร carbofuran 3G พบว่าน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าเฉลี่ยจำนวนปม และจำนวนกลุ่มไข่ ในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ทั้ง 2 ไอโซเลตและกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร carbofuran 3G ต่ำกว่ากรรมวิธีที่ไม่ได้คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรียหรือสารเคมีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* หรือสาร carbofuran 3G (ตารางที่ 2)

ปีงบประมาณ 2557 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* 8 ไอโซเลต ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ไอโซเลตจากมันฝรั่ง ได้ผลการทดลองดังนี้

<u>น้ำหนักแห้งต้น</u>

พบว่ากรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยรากปม และกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) มีน้ำหนักแห้งต้นเฉลี่ยสูงสุด คือ 0.75 กรัม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลต PP121 PP695 PP705 PP720 PP722 และ PPR70 แต่แตกต่างกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP689 และ PP735 กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos และกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยและสารใดๆ (non-inoculated control) (ตารางที่ 3)

<u>น้ำหนักราก</u>

กรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP121 มีน้ำหนักรากเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.64 กรัม ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP689 PP705 PP722 PP735 และ PPR70 แต่แตกต่างกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP695 PP720 กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos กรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) และกรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยและสารใดๆ (non-inoculated control) (ตารางที่ 3)

<u>จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในรากและเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีสปอร์ของ P. penetrans</u>

กรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* มีจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในรากไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว ยกเว้นกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP735 มีจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในรากมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos 10G มีจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในรากน้อยที่สุด (ตารางที่ 3) กรรมวิธีที่มีเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัยเพศเมียที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* สูงที่สุดคือกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซ

เลต PP705 และ PP722 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลาย 58.0 และ 52.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

จำนวนกลุ่มไข่ต่อราก

กรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP689 PP695 PP705 PP720 PP722 และกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos มีจำนวนกลุ่มไข่ต่อรากน้อยกว่ากรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) ส่วนกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลต PP121 PP735 และ PPR70 มีจำนวนกลุ่มไข่ต่อรากไม่แตกต่างจากกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control)

จำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดิน

จำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดิน ในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) (ตารางที่ 3) ส่วนกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos ไม่พบตัวอ่อนระยะที่สองในดิน

เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัว

พบว่ากรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* ไอโซเลต PP705 มีเปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัวมากที่สุดคือ 36.04% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* ไอโซเลตอื่นๆ (ตารางที่ 3)

ปีงบประมาณ 2558 ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *P. penetrans* 4 ไอโซเลต ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ไอโซเลตจากพริกไทย ได้ผลการทดลองดังนี้

น้ำหนักต้น

พบว่ากรรมวิธีที่ไม่ใส่ไส้เดือนฝอยและสารใดๆ (non-inoculated control) มีน้ำหนักต้นเฉลี่ยสูงที่สุด ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต PP705 PPR70 และกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) กรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos มีน้ำหนักต้นต่ำที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต PP122 PP720 PPR70 และกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) (ตารางที่ 4)

น้ำหนักราก

น้ำหนักรากมะเขือเทศในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในราก

จำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในรากในทุกกรรมวิธีไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4)

จำนวนกลุ่มไข่ต่อราก

จำนวนกลุ่มไข่ต่อรากในกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) มากที่สุดแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต PP122 PP705 และ PP720 จำนวนกลุ่มไข่ต่อรากในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos น้อยที่สุด จำนวนกลุ่มไข่ต่อรากในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต PPR70 มากกว่ากรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos แต่น้อยกว่ากรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต PP122 PP705 และ PP720 และกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) (ตารางที่ 4)

จำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดิน

จำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดินในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสาร cadusafos อยู่ในระดับต่ำที่สุด จำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดินในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต ไม่แตกต่างกับกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) (ตารางที่ 4)

เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัว

พบว่าเปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัวอยู่ในระดับที่ต่ำมากในทุกกรรมวิธี โดยในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของแบคทีเรีย *P. penetrans* ไอโซเลต PP122 มีเปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัวมากที่สุด คือ 2.63% (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการคลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* สามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ อย่างไรก็ตามจำนวนประชากรตัวอ่อนระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปมในดินในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วยสปอร์ของ *P. penetrans* และกรรมวิธีที่ใส่ไส้เดือนฝอยเพียงอย่างเดียว (inoculated control) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เปอร์เซ็นต์ตัวอ่อนระยะที่สองในดินที่มีสปอร์ของ *P. penetrans* เกาะบนผนังลำตัวค่อนข้างต่ำ อย่างไรก็ตามการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมด้วยแบคทีเรีย *P. penetrans* เป็นการควบคุมในระยะยาว ตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมที่ถูกเข้าทำลายจะผลิตสปอร์ของ *P. penetrans* ภายในตัวประมาณตัวละ 2×10^6 สปอร์ต่อตัวโดยเฉลี่ย ซึ่งสปอร์เหล่านี้จะลงสู่ดินเมื่อรากย่อยสลาย และเกาะผนังลำตัวของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองที่อยู่ในดินและเข้าทำลายต่อไป ปริมาณสปอร์ของ *P. penetrans* ในดินจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับที่สามารถควบคุมไส้เดือนฝอยได้ จากผลการทดลองถึงแม้ว่าจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียภายในรากจะไม่แตกต่างกันระหว่างกรรมวิธีที่คลุกดินและไม่คลุกดินด้วย *P. penetrans* แต่ในกรรมวิธีที่คลุกดินด้วย *P. penetrans* มีจำนวนตัวเต็มวัยเพศเมียที่ถูกเข้าทำลายมากกว่า 50% ในบางไอโซเลต ซึ่งตัวเต็มวัยที่ถูกเข้าทำลายเหล่านี้มีสปอร์ของ *P. penetrans* เจริญอยู่ภายในตัวและจะถูกปล่อยลงสู่ดินต่อไป ในการทดลองนี้พบว่าจำนวนตัวอ่อนระยะที่สองในดินที่มีสปอร์เกาะบนผนังลำตัวค่อนข้างน้อย ซึ่งอาจเป็นเพราะสปอร์ของ *P. penetrans* รุ่นใหม่ที่ผลิตในตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมยังไม่ถูกปล่อยลงสู่ดิน แต่สปอร์ที่เกาะบนผนังลำตัวไส้เดือนฝอยคือสปอร์ที่คลุกดินเมื่อเริ่มทดลองที่ยังอยู่ในดิน ผลการทดลองที่ได้จากการใช้ *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ไอโซเลตจากมันฝรั่งและพริกไทยให้ผลที่ค่อนข้างแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Tzortzkakis et al. (1996) ซึ่งทดสอบศักยภาพของ แบคทีเรีย *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าการเกาะของสปอร์แบคทีเรียบนผนังลำตัวของไส้เดือนฝอยรากปมมีความแปรปรวนที่เกิดจากความหลากหลายของ biotypes ของประชากรไส้เดือนฝอยรากปม ความสัมพันธ์ของอัตราการเกาะของสปอร์ กับความเข้มข้นของสปอร์ไม่เป็นลักษณะเชิงเส้นตรง (linear) ถึงแม้ว่าจะใช้สปอร์ที่ความเข้มข้นสูง ก็ไม่สามารถมั่นใจได้ว่าสปอร์จะเกาะและเข้าทำลายไส้เดือนฝอยทุกตัว นอกจากนี้ยังพบว่าการที่มีตัวอ่อนระยะที่สองที่มีสปอร์ของแบคทีเรียติดอยู่จำนวนมาก ไม่ได้ลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยได้มากขึ้นเสมอไป ทั้งนี้เป็นผลจากความแตกต่างของ biotypes ของไส้เดือนฝอยรากปม ดังนั้นการใช้แบคทีเรีย *P. penetrans* ให้มีประสิทธิภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมจึงควรใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ (Tzortzakakis and Gowen, 1994) และการใช้ *P. penetrans* หลายไอโซเลตร่วมกันอาจทำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งควรมีการทดลองต่อไป

Table 1 Detection of *P. penetrans* in *Meloidogyne* spp. adult females from *S. tuberosum* cv. Atlantic *and C. parvifolius* and from root powder of *C. annuum*

Plant species	Sample type	No. of sample	No. of positive detection	%
S. tuberosum	Adult females	632	21	3.3
C. parvifolius	Adult females	105	88	83.8
C. annuum	Root powder	95	5	5.3

Table 2 Average shoot dry weight, galls and eggmasses number

Treatments	Plant dry weight	No. of galls†	No. of eggmass †
Control	2.06	49b	14b
PP122 (*S. tuberosum*)	1.63	16a	3a
PPR70 (*C. annuum*)	1.79	16a	3a
Carbofuran 3G	1.53	12a	4a
F-Test	ns	*	*
CV (%)	29.64	79.49	48.91

† Numbers in the same column with the same letter are not significantly different at 95% level by DMRT

* = Significantly different at 95% level

Table 3 Average shoot dry weight, root weight, number of adult females in the root, percent infected females, number of eggmasses on the root, number of spore encumbered second stage juveniles on *Solanum lycopercicum* cv. Sida 45 days after inoculated with 600 second stage juveniles of *M. incognita* (Potato isolate)

Treatment	Shoot dry weight (g)†	Root weight (g)†	No. of adult females in the root	Percent infected females (%)	No. of eggmasses on the root†	No. of second stage juveniles in the soil†	Percent encumbered second stage juveniles (%)†
PP121 (*S. tuberosum*)	0.51 abc	1.64 a	219 ab	46.0 ab	63 ab	12,754 ab	14.5 b
PP689 (*C. parvifolius*)	0.41 bc	1.28 ab	123 bc	26.2 b	48 bc	7,915 ab	3.1 bcd
PP695 (*C. parvifolius*)	0.53 abc	1.03 b	152 bc	35.0 ab	48 bc	15,312 a	1.4 cd
PP705 (*C. parvifolius*)	0.62 abc	1.60 a	181 abc	58.0 a	35 bc	8,645 ab	25.8 a
PP720 (*C. parvifolius*)	0.48 abc	1.05 b	110 bc	38.0 ab	29 c	5,052 b	9.0 bc
PP722 (*C. parvifolius*)	0.59 abc	1.29 ab	124 bc	52.5 a	55 bc	16,460 a	6.6 bc
PP735 (*C. parvifolius*)	0.40 c	1.29 ab	292 a	39.0 ab	84 ab	6,432 ab	4.2 bc
PPR70 (*C. annuum*)	0.72 ab	1.35 ab	192 abc	38.0 ab	69 ab	6,416 ab	10.2 b
Cadusafos 10G	0.32 c	0.54 cd	2 d	0.0 c	0 d	0 c	-
Inoculated	0.75 a	0.99 bc	131 bc	0.0 c	125 a	9,108 ab	0.0 d
Non-inoculated	0.39 c	0.47 d	-	-	0 d	0 c	-
F -test	*	**	**	**	**	**	**
C.V. (%)	28.41	32.24	13.41	27.77	18.80	20.66	27.12

†Numbers in the same column with the same letter are not significantly different at 95% level by DMRT

* = Significantly different at 95% level

** = Significantly different at 99% level

Table 4 Average shoot weight, root weight, number of adult females in the root, number of eggmasses on the root, number of spore encumbered second stage juveniles on *Solanum lycopercicum* cv. Sida 45 days after inoculated with 600 second stage juveniles of *M. incognita* (Black Pepper Isolate)

Treatment	Shoot weight (g)†	Root weight (g)†	No. of adult females in the root	No. of eggmasses on the root†	No. of second stage juveniles in the soil†	Percent encumbered second stage juveniles (%)†
PP122 (*S. tuberosum*)	18.2 bc	3.2	388	99 ab	10,176 a	2.63 a
PP705 (*C. parvifolius*)	20.8 ab	3.3	376	141 a	18,496 a	0.20 c
PP720 (*C. parvifolius*)	18.3 bc	3.0	275	135 a	16,888 a	0.49 b
PPR 70 (*C. parvifolius*)	19.4 abc	3.3	270	62 b	18,748 a	0 c
Cadusafos 10G	16.3 c	2.6	198	45 c	6,488 b	0 c
Inoculated	19.1 abc	3.5	426	160 a	20,752 a	0 c
Non-inoculated	21.6 a	3.0	-	-	-	-
F -test	*	ns	ns	**	**	**
C.V. (%)	50.27	41.93	13.41	11.73	12.09	15.56

†Numbers in the same column with the same letter are not significantly different at 95% level by DMRT

* = Significantly different at 95% level

** = Significantly different at 99% level

Fig 1 *P. penetrans* spores attach to the second stage juvenile cuticle (A), the uninfected female produces eggs inside the eggmass but the *P. penetrans*-infected female is unable to produce eggs (B), but approximately 2X10^{6} *P. penetrans* spores (C) are produced inside the body.

การทดลองที่ 3.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus* spp

ผลการทดลอง

การดำเนินงานในงบประมาณปี 2557 เก็บตัวอย่างดินทั้งสิ้น 167 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกมันฝรั่ง ฝรั่ง ถั่วเหลือง ส้ม และมันสำปะหลัง ตรวจพบไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. เฉพาะตัวอย่างดินจากแปลงมันฝรั่งและส้ม แต่ยังตรวจไม่พบไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. ที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. เกาะบนผนังลำตัว (ตารางที่ 1) ในปีงบประมาณ 2558 เก็บตัวอย่างดินทั้งสิ้น 111 ตัวอย่าง จากแปลงปลูกมันฝรั่ง กล้วย และ หอมแดง ตรวจพบไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. 46 ตัวอย่าง แต่ยังตรวจไม่พบไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. ที่มีสปอร์ของแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการตรวจหาแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ในไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในปี 2557

ชนิดพืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่พบไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม	จำนวนตัวอย่างที่พบไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มที่มีสปอร์ของ *Pasteuria* spp.
มันฝรั่ง	จ. ตาก	36	6	0
ฝรั่ง	จ. นครปฐม	27	0	0
ถั่วเหลือง	จ. นครสวรรค์	7	0	0
ส้ม	จ. เชียงใหม่	39	27	0
มันสำปะหลัง	จ. กำแพงเพชร	58	0	0
	รวม	167	33	0

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจหาแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ในไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากแหล่งต่างๆ ในปี 2558

สถานที่เก็บตัวอย่างดิน	พืช	จำนวนตัวอย่างดิน	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ *Rotylenchulus* spp.	ปริมาณไส้เดือนฝอยที่พบในตัวอย่างดิน 250 กรัม			ตัวอย่างที่ตรวจพบ *Rotylenchulus* spp. ที่มีสปอร์ของ *Pasteuria* spp.
				1 - 49	50 -100	> 100	
จ. ตาก	มันฝรั่ง	65	41	28	7		0
จ. สกลนคร	มันฝรั่ง	30	0	0	0	0	0
จ. เชียงใหม่	กล้วย	6	1	1	0	0	0
จ. ศรีสะเกษ	หอมแดง	10	4	4	0	0	0
	รวม	111	45	33	0	0	0

กิจกรรมย่อยที่ 3.5 การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.5.1 การคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

ผลการทดลอง

1. การแยกและจำแนกกลุ่มเชื้อราเอ็นโดไฟท์

1.1 การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างต้นพืชสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ น้ำนมราชสีห์ ขิงป่า สาบเสือ โดยเก็บต้นปกติที่ไม่มีการเข้าทำลายของแมลงและไม่มีอาการของโรค ในเขต อ.สันทราย จ.เชียงใหม่

1.2 การทดสอบการฆ่าเชื้อที่ผิว

ได้ความเข้มข้นและระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับฆ่าเชื้อส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบ ลำต้น และราก ของพืชทั้ง 3 ชนิด คือ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 1% เป็นเวลา 3 นาที ดังที่ Umali *et al* (1999) กล่าวว่า เวลาที่ใช้ในการแช่โซเดียมไฮโปคลอไรต์ยิ่งนานจะทำให้ใบยิ่งซีดจางจนเนื้อเยื่อตายและทำให้ได้เชื้อราจำนวนน้อย

1.3 การแยกเชื้อราเอ็นโดไฟท์

สามารถแยกเชื้อราเอนโดไฟท์ได้ 91 ไอโซเลท ในต้นน้ำนมราชสีห์พบมากที่สุดในส่วนลำต้น 11 ไอโซเลท

ขิงป่าพบมากที่สุดในส่วนราก 17 ไอโซเลท และต้นสาบเสือพบมากที่สุดในส่วนราก 28 ไอโซเลท

1.4 การตรวจสอบและจำแนกกลุ่มของเชื้อราเอ็นโดไฟท์

ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยา สังเกตลักษณะการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่เพาะเลี้ยง ตรวจลักษณะรูปร่าง ขนาดและโครงสร้างที่เชื้อราสร้างขึ้น ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถจำแนกกลุ่มของเชื้อราได้ 13 กลุ่ม ได้แก่ *Colletotrichum* spp., *Eupenicillium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. Mycelia sterilia 1- 9 โดยเชื้อราเอนโดไฟต์ที่พบมากที่สุดได้แก่ เชื้อรา *Colletotrichum* spp. รองลงมาได้แก่ *Eupenicillium* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. และ Mycelia sterilia ตามลำดับ ซึ่งเชื้อราเอ็นโดไฟท์ ที่แยกได้ส่วนมากจะไม่เป็นสาเหตุของการเกิดโรค เพราะการจะเกิดโรคได้นั้นต้องมีความสัมพันธ์ระหว่างพืชอาศัย เชื้อสาเหตุ และสภาพแวดล้อม (Sinclair, 1991)

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอ็นโดไฟท์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

2.1 การทดสอบในห้องปฏิบัติการ

นำเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรมาทดสอบประสิทธิภาพในการยังยั้งการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture จำนวน 20 ไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อราในแต่ละกลุ่ม วัดผลการเจริญของเชื้อรา *S. rolfsii* ที่ 1,3, 5 และ 7 วัน วัดเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง และนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าเชื้อราเอนโดไฟต์ Mycelia sterile 3 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด 68.56% รองลงมาคือ *Eupenicillium* spp. No. 01(63.56%), *Eupenicillium* spp. No. 03 (62.14%), *Eupenicillium* spp. No. 02 (60.35%) และ *Eupenicillium* spp. No. 05(54.99%) ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่แตกต่างจากเชื้อราอีก 15 ไอโซเลท ซึ่งมีการยับยั้งอยู่ในช่วง 0 - 17.85% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟท์ที่คัดเลือกมามีรูปแบบในการยับยั้งการเจริญ 3 รูปแบบ คือ เชื้อราเอนโดไฟท์เจริญชนกับเชื้อราสาเหตุ เชื้อราเอนโดไฟท์เจริญคลุมเชื้อสาเหตุ และการเจริญแบบต้านกันไว้ (เกิด clear zone) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Baker and Cook (1974) ได้กล่าวไว้ว่า จุลินทรีย์ที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้านนั้นจะมีกลไกการเข้าทำลาย 3 ขบวนการ คือ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแข่งขันซึ่งกันและกัน และการเป็นปรสิตกับอีกชนิดหนึ่ง

2.2 การทดสอบในโรงเรือน

2.2.1 การศึกษาผลของเชื้อราเอนโดไฟท์ต่อการงอกของเมล็ดพริก

การหาเปอร์เซ็นต์ความงอกพบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา Mycelia sterilia 3 มีเปอร์เซ็นต์ความงอกสูงสูด 83.75%แต่ไม่แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

การวัดความยาวของต้น *Eupenicillium* spp. No. 03 มีความยาวของลำต้นมากที่สุด 13.84 ซม. มีความแตกต่างกับทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95%

การหาน้ำหนักสด พบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา Mycelia sterilia 3 มีน้ำหนักสดสูงสุดไม่ต่างจากการแช่ด้วย *Eupenicillium* spp. No. 03 และน้ำกลั่นนึ่ง แต่แตกต่างจาก *Eupenicillium* spp. No. 05, *Eupenicillium* spp. No. 02 และ *Eupenicillium* spp. No. 01

การหาน้ำหนักแห้งพบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา Mycelia sterilia 3 มีน้ำหนักแห้งสูงสุดไม่ต่างจากการแช่ด้วย *Eupenicillium* spp. No. 03, *Eupenicillium* spp. No. 02 และ *Eupenicillium* spp. No. 05 แต่แตกต่างจาก *Eupenicillium* spp. No. 01 และน้ำกลั่นนึ่ง ซึ่งเชื้อราเอนโดไฟท์อาจช่วยส่งเสริมให้พืชมีความงอกดีขึ้น และต้นกล้ามีความแข็งแรงมากขึ้นสอดคล้องกับ ที่ Clay (1989) ได้ศึกษาไว้

2.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์ในโรงเรือน

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการแช่เมล็ด

หลังจากที่ปลูกเชื้อรา *S. rofsii* ลงไป พบว่า 3 วัน ต้นพริกเริ่มแสดงอาการของโรค วันที่ 5 อาการของโรคเริ่มรุนแรงขึ้น และวันที่ 7 พบอาการรุนแรงสูงสุด ต้นเหี่ยวตายและอาการของโรคเริ่มคงที่ เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคแล้ว พบว่าการแช่ด้วยเชื้อรา *Eupenicillium* spp. No. 03 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 2.73 *Eupenicillium* spp. No. 05 (2.93), *Eupenicillium* spp. No. 02 (2.98), *Eupenicillium* spp. No. 01 (3.00), Mycelia sterilia 3 (3.03) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (3.03) มีความรุนแรงของโรคต่ำสุดจนถึงสูงสุดตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อดูในภาพรวมแล้วมีการเกิดโรคในระดับ 3 (แสดงอาการเหี่ยว 25%)

2.2.2.1 ประสิทธิภาพของเชื้อราเอนโดไฟท์โดยการราดดิน

หลังจากที่ปลูกเชื้อรา *S. rofsii* ลงไป พบว่า 3 วัน ต้นพริกเริ่มแสดงอาการของโรค วันที่ 5 อาการของโรคเริ่มรุนแรงขึ้น และวันที่ 7 พบอาการรุนแรงสูงสุด ต้นเหี่ยวตาย และอาการของโรคคงที่ เมื่อประเมินความรุนแรงของโรคแล้ว พบว่าการราดด้วยเชื้อรา *Eupenicillium* spp. No. 05 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ระดับ 2.18 *Eupenicillium* spp. No. 02 (2.20), *Eupenicillium* spp. No. 03 (2.28), *Eupenicillium* spp. No. 01 (2.35), Mycelia sterilia 3 (2.38) และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (2.45) มีความรุนแรงของโรคต่ำสุดจนถึงสูงสุดตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% เมื่อดูในภาพรวมแล้วมีการเกิดโรคในระดับ 2 (เกิดแผลที่โคนต้นอย่างเดียว)

จากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ และในโรงเรือนให้ผลที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับสภาพที่อยู่ในการทดลองที่เอื้อต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุ ตามที่ Baker and Cook (1974) ได้กล่าวไว้ว่า ซึ่งในการทดลองในห้องปฏิบัติการอาจให้ผลที่แตกต่างไปจากในสภาพโรงเรือนได้

การทดลองที่ 3.5.2 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

ผลการทดลอง

ในปี 2554-2556 เชื้อราที่สามารถแยกเชื้อได้มาจากการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม การแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง และแยกเชื้อราจากไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม เนื่องจากการแยกจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นใช้ดินเป็นองค์ประกอบของวิธีการซึ่งสามารถแยกเชื้อราที่อาศัยในดินรวมมาด้วย การการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราได้มากว่าจากไข่เดี่ยวๆของไส้เดือนฝอยรากปมอาจเพราะขั้นตอนการละลายเมือกหุ้มถุงไข่ เก็บ suspension เกิดการปนเปื้อนมาก ส่วนการแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำได้ พืชที่แยกเชื้อราได้มาก ได้แก่ ฝรั่ง ผักเสี้ยนผี บวบ ตำแยแมว และหญ้ายาง เป็นเพราะความถี่ของการได้ตัวอย่าง และปริมาณตัวอย่าง และส่วนใหญ่เป็นวัชพืชที่อยู่ในแปลงทั่วไปอาจจะไม่ได้รับสารเคมีกำจัดเชื้อรา แหล่งที่สามารถแยกเชื้อราได้เช่น แหล่งดินแปลงผักเก่า มันขี้หนู พริก มะเขือเทศ องุ่น มันฝรั่ง มะเขือยาว ขิง กะหล่ำปลี ข้าวโพด คะน้า แครอท ผักโขมหนาม มะเขือเปราะ แตงโม เป็นต้น โดยแยกได้ถึง 156 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา 2 ชนิด (species) 8 สกุล (genera) ได้แก่เชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Paecilomyces lilacinus* สกุล *Trichoderma* sp. *Monacrosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Verticillium* sp. *Paecilomyces* sp. *Anthrobotrys* sp. และเชื้อราอื่นที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้

ในปี 2557 ทำการทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยใช้เชื้อรา *Fusarium* sp.

ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 และ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1 - 2 ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 6 ใส่ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ให้ผลดีทั้งในการลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศซึ่งกรรมวิธีอื่นๆไม่สามารถลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (ตารางที่ 1และ ตารางที่ 2) ส่วนน้ำหนักแห้งของต้นมะเขือเทศและน้ำหนักรากสดไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

กรรมวิธีที่ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 ทำให้พืชทดลองตายไป 3 ต้น ทำให้ไม่สามารถนำมาคำนวณทางสถิติร่วมกับกรรมวิธีอื่นๆได้ สามารถนำชนิดเชื้อรา *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยในกระถางทดลองไปทดสอบศักยภาพในระดับแปลงทดลองได้

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมที่ตรวจพบจากตัวอย่างดินในกระถางทดลองของแต่ละกรรมวิธี

TABLE OF TRT (T) MEANS FOR NEMATODES (NO.\PL.)

TRT	RANKS	MEANS
T1	5	104.4 bc
T3	2	52.0 ab
T4	4	58.5 abc
T5	6	132.8 c
T6	1	15.5 a
T7	3	54.0 ab
MEAN		73.3

ค่าเฉลี่ยของจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยระดับนัยสำคัญที่ 5%

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ตรวจพบในรากมะเขือเทศของแต่ละกรรมวิธี

TABLE OF TRT (T) MEANS FOR NEMATODES (NO.\PL.)

TRT	RANKS	MEANS
T1	5	25.6 bc
T3	2	8.5 a
T4	4	19.5 b
T5	6	32.2 c
T6	1	6.5 a
T7	3	19.0 b
MEAN		19.3

ค่าเฉลี่ยของจำนวนกลุ่มไข่ไส้เดือนฝอยรากปมที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแต่ละกรรมวิธี ไม่แตกต่างกันทางสถิติโดยวิธี DMRT ด้วยระดับนัยสำคัญที่ 5%

รูปภาพที่ 1- 5 แสดงตัวอย่างการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในกรรมวิธีที่ 1,2,3,5 และ 7 ซึ่งปรากฏกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม และลักษณะอาการปมของรากมะเขือเทศ

T3R4

T5R2

รูปภาพที่ 6 แสดงตัวอย่างการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในกรรมวิธีที่ 6 ซึ่งปรากฏกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม และลักษณะอาการปมของรากมะเขือเทศน้อย

รูปภาพที่ 7 แสดงตัวอย่างการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมในกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งไม่พบทั้งกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปม และลักษณะอาการปมของรากมะเขือเทศ

การทดลองที่ 3.5.3 การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคพืช (non-pathogenic *Fusarium*) ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน การแยกเชื้อรา และการจำแนกชนิด

ได้ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ กล้วยน้ำว้า แก้วมังกร ข้าวโพด แตง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราบริสุทธิ์บนอาหารวุ้น PDA (Potato Dextrose Agar) และจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* sp. ที่พบ

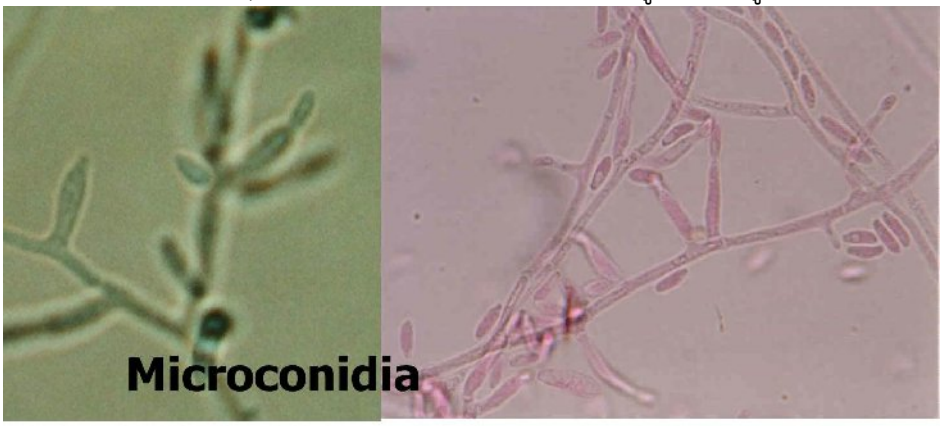
จากการแยกเชื้อด้วยวิธี soil dilution plate technique บนอาหาร PDA แล้วทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single–spore technique บนอาหาร WA จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อราที่พบ โดยศึกษาลักษณะของสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ CLA ตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983) พบว่าเชื้อราที่ได้คือ เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 35 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ซึ่งแยกได้จากดินปลูก 10 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด คะน้า แตง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ จาก 15 จังหวัด (ตารางที่ 1) เชื้อรา *F. oxysporum* ที่เก็บรวบรวมได้ทั้ง 35 ไอโซเลท มีลักษณะสำคัญที่เหมือนกันดังนี้

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA : เชื้อราสร้างเส้นใยฟู ละเอียด สีขาว สีขาวแซมม่วง สีชมพูม่วง สีม่วงอ่อน จนถึงสีม่วงเข้ม เจริญอย่างรวดเร็ว สร้าง sporodochium สีส้มจำนวนมาก โคโลนีด้านใต้ผิวอาหารมีสีม่วงอ่อน ม่วงเข้ม หรือน้ำเงินเข้ม และสร้างเม็ด sclerotium สีน้ำเงิน

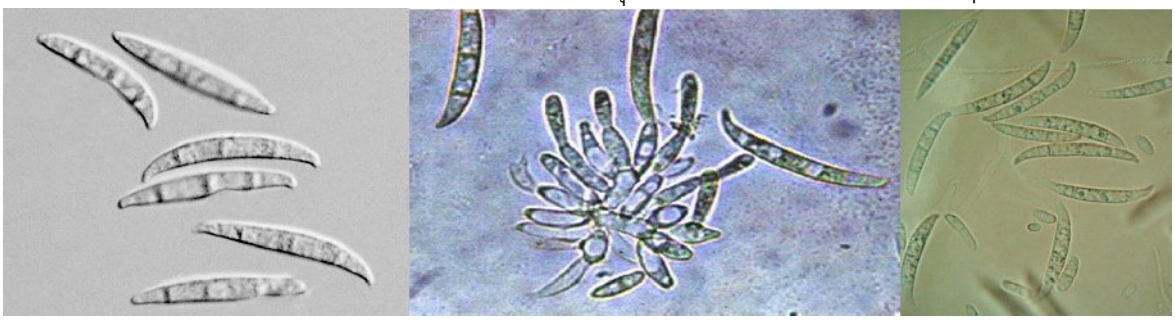
ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA

ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA

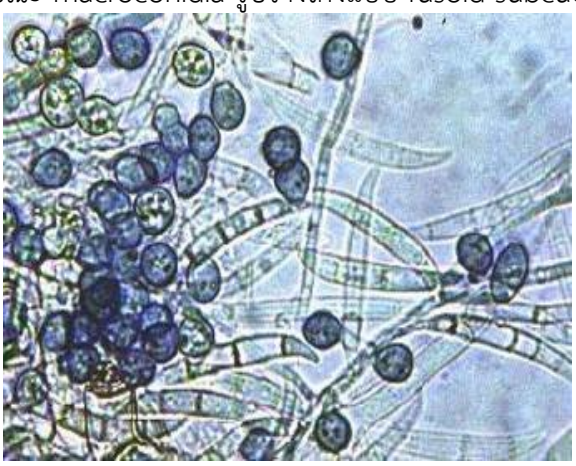
ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA : เชื้อราสร้าง microconidium จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide ซึ่งเกิดจากด้านข้างของเส้นใย phialide รูปร่างคล้ายขวดหรือพินโบว์ลิ่ง ไม่มีสี มีขนาดสั้นกว่า phialide ของ *F. moniliforme* และ *F. solani* microconidia รูปไข่ ยาวรี สั้นป้อม จนถึงรูปทรงกระบอก ไม่มีสี มี 1-2 เซลล์ ส่วนใหญ่มี 1 เซลล์ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate เซลล์ที่ฐานมีลักษณะคล้ายเท้า (foot-shaped) เซลล์ที่ปลายเรียวแหลม หรือทู่มน ผนังบาง ไม่มีสี มี septum 3-5 ขนาด 24-26 x 3-4.5 ไมครอน เกิดบน conidiophore ที่แตกกิ่งก้านมากหรือเกิดบน sporodochium ที่มีลักษณะเป็นก้อน (tubercularia-like) เชื้อราชนิดนี้สร้าง chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม ผนังเรียบหรือผนังขรุขระ เกิดที่บริเวณส่วนปลายเส้นใย (terminal) และส่วนกลางเส้นใย (intercalary) มักเกิดเดี่ยว แต่บางครั้งเกิดเป็นคู่หรือเป็นลูกโซ่



ลักษณะ microconidia จำนวนมากเกาะเป็นกลุ่มแบบ false head บน monophialide



ลักษณะ macroconidia รูปร่างโค้งแบบ fusoid-subculate



chlamydospore รูปไข่ หรือทรงกลม

โดยปกติเชื้อราชนิดนี้ เป็นเชื้อราโรคพืชทำให้เกิดโรคเหี่ยว (vascular wilt) กับพืชหลายชนิด เป็นราที่มีพืชอาศัยกว้างมาก ทำความเสียหายกับพืชมากที่สุด และมีความสามารถทำให้เกิดโรคเฉพาะกับพืช โดยลักษณะของสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) ในพืชทดสอบต่อไป

ตารางที่ 1 เชื้อรา *F. oxysporum* (FO) จำนวน 35 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมได้จากดินปลูกพืชในประเทศไทยระหว่างเดือนมกราคม 2555 – เดือนกันยายน 2556

ไอโซเลท	ดินจากพืช	สถานที่
FO1	ดินปลูกพริก	อ.ศรีสวัสดิ์ จ.กาญจนบุรี
FO2	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
FO3	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.ฮอด จ.เชียงใหม่
FO4	ดินป่า	อ.พบพระ จ.ตาก
FO5	ดินป่า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO6	ดินป่า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO7	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.นครชัยศรี จ.นครปฐม
FO8	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
FO9	ดินปลูกแตง	อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี
FO10	ดินปลูกผักหวานบ้าน	อ.สว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี
FO11	ดินปลูกเบญจมาศ	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
FO12	ดินปลูกปาล์มน้ำมัน	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี
FO13	ดินปลูกปาล์มน้ำมัน	อ.เวียงสระ จ.สุราษฎร์ธานี
FO14	ดินปลูกปาล์มน้ำมัน	อ.เมือง จ.ตรัง
FO15	ดินมะเขือเทศ	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
FO16	ดินเบญจมาศ	อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
FO17	ดินปลูกผักหวานบ้าน	อ.สว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี
FO18	ดินปลูกผักหวานบ้าน	อ.สว่างวีระวงศ์ จ.อุบลราชธานี
FO19	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.พบพระ จ.ตาก
FO20	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO21	ดินปลูกกล้วยน้ำว้า	อ.แม่สอด จ.ตาก
FO22	ดินปลูกเบญจมาศ	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
FO23	ดินปลูกข้าวโพด	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
FO24	ดินปลูกฝรั่ง	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
FO25	ดินปลูกฝรั่ง	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
FO26	ดินปลูกพริก	อ.ศรีเชียงใหม่ จ.หนองคาย
FO27	ดินปลูกพริก	อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย
FO28	ดินปลูกพริก	อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย
FO29	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.เมือง จ.บึงกาฬ

ตารางที่ 1 (ต่อ) เชื้อรา *F. oxysporum* (FO) จำนวน 35 ไอโซเลทที่เก็บรวบรวมได้จากดินปลูกพืชในประเทศไทยระหว่างเดือนมกราคม 2555 – เดือนกันยายน 2556

ไอโซเลท	ดินจากพืช	สถานที่
FO30	ดินปลูกมะเขือเทศ	อ.บุ่งคล้า จ.บึงกาฬ
FO31	ดินปลูกโหระพา	อ.นางรอง จ.บุรีรัมย์
FO32	ดินปลูกพริก	อ.เทพสถิต จ.ชัยภูมิ
FO33	ดินปลูกคะน้า	อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี
FO34	ดินป่า	อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
FO35	ดินป่า	อ.ไทรโยค จ.กาญจนบุรี

2. การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) และผลกระทบของเชื้อรา *F. oxysporum* ที่แยกได้ต่อต้นมะเขือเทศ ตามวิธีการของ Da Silva และคณะ (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato

การตรวจสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยปลูกเชื้อรา *F.* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) แยกได้จากดินปลูกพืชและดินตามป่าธรรมชาติ ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด คะน้า แตง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ บนต้นพืช จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า หลังจากย้ายต้นพืชลงปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน เชื้อรา *F. oxysporum* ส่วนใหญ่ทำให้กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ แสดงอาการใบล่างเริ่มเหี่ยว กลายเป็นสีเหลืองในวันต่อไป และหลังจากวันที่ 45 เป็นต้นไปใบที่เหลืองจะแห้ง ฟุบตัว ขณะเดียวกันใบด้านบนใบอื่น ๆ ก็เริ่มต้นอาการโรคในลักษณะเดียวกัน เมื่อผ่าดูด้านในต้นพืชที่เป็นโรค พบท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ และร่วง ขณะที่ต้นพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* และต้นพืชที่ใช้ชิ้นวุ้น PDA แทนเชื้อรา มีการเจริญเป็นปกติ ไม่พบอาการเหี่ยวของใบหรือต้น และไม่พบอาการเน่าภายในท่อลำเลียงของพืช

มีเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ FO4, FO5, FO6, FO12, FO23, FO34 และ FO35 ที่ไม่ทำให้พืชทดสอบ 8 ชนิด เกิดอาการโรคเหี่ยวหรืออาการท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาล ซึ่งจะได้นำเชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลท รวมถึงไม่ได้ทำให้ต้นมะเขือเทศเกิดโรคเหี่ยว จึงนำไปทำการศึกษาต่อไป (ตารางที่ 2)

เมื่อนำเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) มาศึกษาผลที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 Oซ พบว่า เชื้อราทั้ง 2 กลุ่มเจริญบนอาหาร PDA ได้ดี โดยเจริญคลุมกัน ไม่มีการแบ่งพื้นที่การยับยั้งการเจริญ จึงทำให้วิเคราะห์และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ไม่ได้

ตารางที่ 2 การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของ *F. oxysporum* บนพืชชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลท	ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืช หลังปลูกพืชในดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* เป็นเวลา 35 วัน [1/]							
	พริก	มะเขือเทศ	ปาล์ม	ผักหวานบ้าน	ข้าวโพด	แตงกวา	กล้วยน้ำว้า	เบญจมาศ
FO1	+	0	0	0	0	0	0	0
FO2	0	+	0	0	0	0	0	0
FO3	0	+	0	0	0	0	0	0
FO4	0	0	0	0	0	0	0	0
FO5	0	0	0	0	0	0	0	0
FO6	0	0	0	0	0	0	0	0
FO7	0	0	0	0	0	0	+	0
FO8	0	0	0	0	0	0	+	0
FO9	0	0	0	0	0	+	0	0
FO10	0	0	0	+	0	0	0	0
FO11	0	0	0	0	0	0	0	+
FO12	0	0	0	0	0	0	0	0
FO13	0	0	0	0	0	0	+	0
FO14	0	0	0	0	0	0	+	0
FO15		+	0	0	0	0	0	0
FO16	0	0	0	0	0	0	0	+
FO17	0	0	0	+	0	0	0	0
FO18	0	0	0	+	0	0	0	0
FO19	0	0	0	0	0	0	+	0
FO20	0	0	0	0	0	0	+	0
FO21	0	0	0	0	0	0	+	0
FO22	0	0	0	0	0	0	0	+
FO23	0	0	0	0	0	0	0	0
FO24	0	0	0	0	0	0	+	0
FO25	0	0	0	0	0	0	+	0
FO26	+	0	0	0	0	0	0	0
FO27	+	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 2 (ต่อ) การตรวจสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค (pathogenicity) ของ *F. oxysporum* บนพืชชนิดต่าง ๆ

ไอโซเลท	ความสามารถในการก่อให้เกิดโรคกับพืช หลังปลูกพืชในดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* เป็นเวลา 35 วัน [1/]							
	พริก	มะเขือเทศ	ปาล์ม	ผักหวานบ้าน	ข้าวโพด	แตงกวา	กล้วยน้ำว้า	เบญจมาศ
FO28	+	0	0	0	0	0	0	0
FO29	0	+	0	0	0	0	0	0
FO30	0	+	0	0	0	0	0	0
FO31	0	0	0	0	0	0	+	0
FO32	+	0	0	0	0	0	0	0
FO33		0	0	0	0	0	+	0
FO34	0	0	0	0	0	0	0	0
FO35	0	0	0	0	0	0	0	0
ไม่ปลูกเชื้อ	0	0	0	0	0	0	0	0
ใช้อาหาร PDB แทนเชื้อรา	0	0	0	0	0	0	0	0

[1/] + = ต้นพืชแสดงอาการ โดยเมล็ดไม่งอก หรือต้นเหี่ยว
0 = ต้นพืชไม่แสดงอาการ โดยเมล็ดงอกปกติ หรือต้นไม่เหี่ยว

3. การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในโรงเรือน ตามวิธีการของ Da Silva *et al*. (2005) ที่ศึกษาวิจัยเรื่อง Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato

หลังจากย้ายต้นพืชลงปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า ต้นมะเขือเทศ ในกรรมวิธีที่ 1 -7 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) และกรรมวิธีที่ 8 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีการเจริญเติบโต ไม่ดีคล้ายกัน โดยอาการเหี่ยวของต้น เริ่มจากใบเหลืองตั้งแต่ใบล่าง แล้วทยอยเหลือง ตั้งแต่เดือนแรกที่ปลูกเชื้อ จนทั้งเหี่ยวทั้งต้นภายในเวลา 2 เดือน เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในลำต้น พบว่า เนื้อเยื่อในท่อลำเลียงมีอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลดำทุกต้น โดยต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในต้น 3.35, 3.60, 3.55, 3.17, 3.33, 3.86, 3.20 และ 3.85 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเทียบระดับการเกิดโรคในต้นมะเขือเทศกรรมวิธีที่ 9 (ต้นมะเขือเทศ + ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) +ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งมีระดับ 1 เป็นระดับการเกิดโรคต่ำ อย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 1 -8 ขณะที่การเจริญของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 9 มีการเจริญเติบโตดี มียอดแตกใบดี ไม่พบใบเหลืองหรือเหี่ยว (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การทดสอบผลของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) ที่มีต่อการเจริญของต้นมะเขือเทศ ที่ปลูกในดินที่มีเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธี	ระดับการเกิดโรคของต้นมะเขือเทศ ที่อายุ 35 วัน [1/]
1. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO4	3.35 b [2/]
2. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO5	3.60 b
3. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO6	3.55 b
4. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO12	3.17 b
5. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO23	3.33 b
6. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO34	3.86 b
7. ดินคลุกเชื้อรา FOL + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* FO35	3.20 b
8. ดินคลุกเชื้อรา FOL + ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)	3.85 b
9. ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา FOL +ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non PhathoFoxy)	1 a
CV (%)	5.7

[1/] ค่าเฉลี่ยของระดับการเกิดโรคจากจำนวน 20 ต้น

[2/] ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันในแต่ละแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT

จากผลการทดลองที่พบว่า กรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในต้น 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคนี้ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* หรือการทำให้เกิดโรคเหี่ยวบนต้นมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตาม หากได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินธรรมชาติหรือดินปลูกพืชให้มากขึ้น คาดว่าคงได้พบเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ในที่สุด

การทดลองที่ 3.5.4 การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma harzianum*ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

ผลการทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อรา *T. harzianum* จากแปลงปลูกพืชของเกษตรกร และฟาร์มเห็ดของเกษตรกร จังหวัดต่างๆ ได้แก่ กาญจนบุรี นครปฐม เชียงใหม่ อุบลราชธานี นครราชสีมา จันทบุรี ระยอง ชลบุรี มาทำการจำแนกในห้องปฏิบัติการ เก็บเชื้อรา *T. harzianum* ที่จำแนกได้ไว้ใช้ในการทดลอง จากการเก็บตัวอย่างดิน พืช และวัสดุเพาะเห็ด 26 ตัวอย่าง สามารถเก็บเชื้อรา *T. harzianum* ได้จำนวน 6 ไอโซเลท เพื่อนำไปใช้ทดลองในโรงเรือนทดลองต่อไป

การทดลองในสภาพเรือนทดลอง

ผลการทดลองพบว่า กรรมวิธีที่ 6 *T. harzianum* ไอโซเลทดินปลูกมะละกอแปลงพืชสวนศรีสะเกษ ให้ผลในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราการเกิดโรคใบจุดคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ในสภาพเรือนทดลอง

กรรมวิธี	อัตราการเกิดโรค				
	ก่อนพ่นครั้งที่ 1	ก่อนพ่นครั้งที่ 2	ก่อนพ่นครั้งที่ 3	หลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน	หลังพ่นครั้งสุดท้าย 14 วัน
1. ไอโซเลทดินต้นเมลอน	3.4	4.1	4.5	4.6 ab	5.2 ab
2. ไอโซเลทดินแปลงพริก	3.4	4.3	4.7	4.8 ab	5.5 ab
3. เชื้อจากเกษตรกรจ. อุบลราชธานี	3.3	4.3	4.5	4.7 ab	5.6 b
4. ไอโซเลทจากก้อนเห็ดภูฏาน	3.2	4.2	4.6	4.8 ab	5.3 ab
5. ไอโซเลทดินถุงปลูกอ้อย	3.4	3.9	4.5	4.6 ab	5.3 ab
6. ไอโซเลทดินปลูกมะละกอแปลงพืชสวนศรีสะเกษ	3.6	4	4.2	4.4 a	5.1 a
7. พ่นน้ำเปล่า	3.2	4	4.6	5 b	6 c
% CV	14.84	8.06	12.14	9.58	8.22

การทดลองในสภาพแปลงทดลอง

ผลการทดลองพบว่า *T. harzianum* จากดินไอโซเลทดินปลูกมะละกอแปลงพืชสวนศรีสะเกษ ให้ผลในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าได้ดีกว่า กรรมวิธีอื่นๆ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการเกิดโรคใบจุดคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ในสภาพแปลทดลอง

กรรมวิธี	อัตราการเกิดโรค				
	ก่อนพ่นครั้งที่ 1	ก่อนพ่นครั้งที่ 2	ก่อนพ่นครั้งที่ 3	ก่อนพ่นครั้งที่ 4	หลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน
1. ไอโซเลทดินต้นเมลอน	1.83	2.63	3.65	4.78 b	5.6 b
2. ไอโซเลทดินแปลงพริก	1.73	2.65	3.83	4.4 ab	5.33 ab
3. เชื้อจากเกษตรกรจ. อุบลราชธานี	1.83	2.58	3.5	4.58 ab	5.55 b
4. ไอโซเลทดินถุงปลูกอ้อย	1.83	2.7	3.5	4.48 ab	5.3 ab
5. ไอโซเลทดินปลูกมะละกอแปลงพืชสวนศรีสะเกษ	1.75	2.6	3.48	4.2 a	5.1 a
6. พ่นน้ำเปล่า	1.85	2.75	3.88	4.83 b	5.6 b
% CV	9.3	5.44	8.31	5.15	4.58

การทดลองที่ 3.5.5 การคัดเลือกเชื้อรา *Oudemansiella* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสกุล *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ในพริก

ผลการทดลอง

1. เลี้ยงและขยายปริมาณเห็ด *Oudemansiella* spp.

ลักษณะเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. จำนวน 4 ไอโซเลทคือ ชช17, สุราษฎร์, หนาว และ L3P เส้นใยมีสีขาวขุ่น มีการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ในอาหาร PDB เหลวที่สะอาดไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เริ่มแรกมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขุ่นขนาดเล็ก ต่อมาก้อนขยายขนาดจนมีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 3.0-5.0 มิลลิเมตร อาหารเหลว PDB ใสไม่ขุ่น ถ้าเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเส้นใยเห็ดก็ยังสามารถเจริญได้แต่อาหารเหลว PDB จะมีลักษณะขุ่นเป็นตะกอน

2. ศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับอบแห้งเส้นใยเห็ด

ลักษณะเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ภายหลังการอบแห้ง เส้นใยจับตัวกันเป็นแผ่นแข็งและเปลี่ยนจากสีขาว-ขาวครีม เป็นสีน้ำตาลเข้ม อุณหภูมิที่ใช้อบเปรียบเทียบ 3 ระดับอุณหภูมิ พบว่าอุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการอบเส้นใยเห็ดคือ 35 องศาเซลเซียสใช้เวลาอบประมาณ 3 วัน ในขณะที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศา ใช้เวลาเร็วกว่าคือ 1-2 วัน แต่เส้นใยเห็ดที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนแข็งจนไม่สามารถนำบดเป็นผงเพื่อนำไปใช้สกัดสารประกอบต่อได้ นอกจากนี้เส้นใยที่อบด้วยอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสยังมีกลิ่นคล้ายกลิ่นไหม้เล็กน้อย

3. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรค

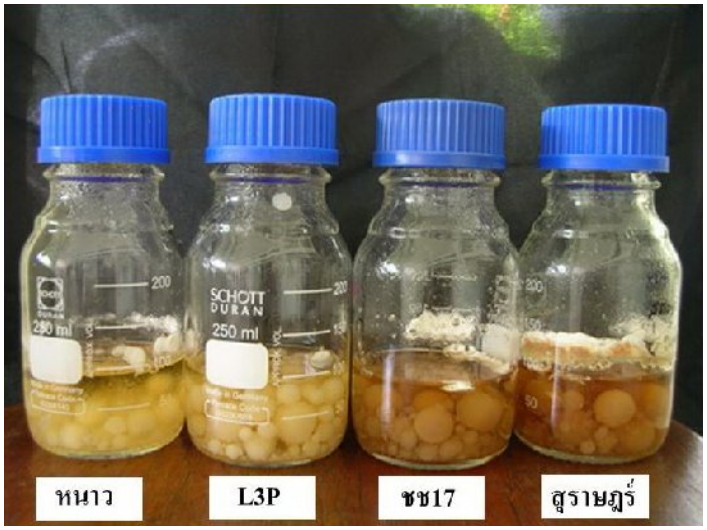
การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชมีลักษณะผิดปกติ โดยเฉพาะเมื่อทดสอบกับเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลท L3P เส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคบริเวณขอบโคโลนีตรงบริเวณที่เส้นใยทั้งสองพบกันหยุดการเจริญและมีลักษณะเป็นสีเข้มผิดจากสีเส้นใยปกติ เมื่อนำเส้นใยบริเวณดังกล่าวไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum* spp. มีลักษณะบิด

เบี้ยว โค้งงอ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ไอโซเลท L3P สามารถเจริญคลุมทับโคโลนีของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคพืชได้ทุกไอโซเลท ในขณะที่ผลการทดลองกับเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. อีก 3 ไอโซเลท เห็นความผิดปกติของเส้นใยเชื้อราบริเวณขอบโคโลนีเจริญเพียงเล็กน้อยไม่ชัดเจนเท่ากับการทดลองกับ *Oudemansiella* spp. ไอโซเลท L3P

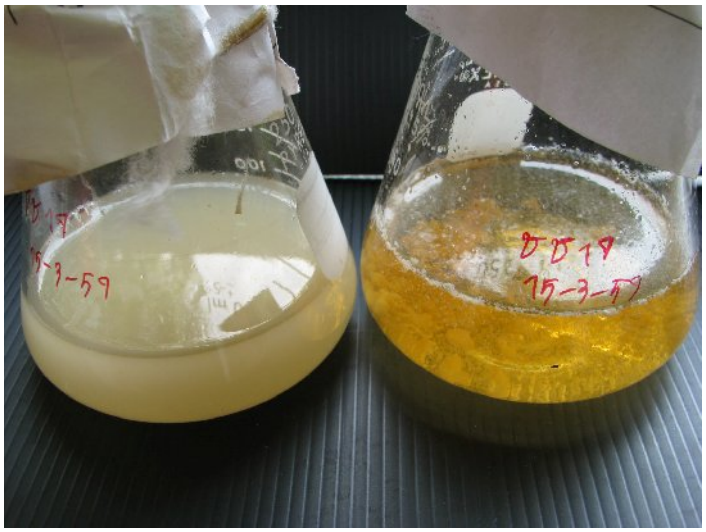
การทดลองที่ 3.5.6 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจาก*Oudermansiella*spp. ต่อการเจริญของรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช

ผลการทดลอง

ลักษณะเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. จำนวน 4 ไอโซเลทคือ ชช17, สุราษฎร์, หนาว และ L3P เส้นใยมีสีขาวขุ่น มีการเจริญของกลุ่มเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ในอาหาร PDB เหลวที่สะอาดไม่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เริ่มแรกมีลักษณะเป็นก้อนกลมสีขาวขุ่นขนาดเล็ก ต่อมาก้อนขยายขนาดจนมีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 3.0-5.0 มิลลิเมตร(ภาพที่ 1) ลักษณะเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. ภายหลังการอบแห้ง เส้นใยจับตัวกันเป็นแผ่นแข็งและเปลี่ยนจากสีขาว-ขาวครีมเป็นสีน้ำตาลเข้ม อุณหภูมิที่ใช้อบเปรียบเทียบ 3 ระดับอุณหภูมิ พบว่า อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับการอบเส้นใยเห็ดคือ 35 องศาเซลเซียสใช้เวลาอบประมาณ 3 วัน ในขณะที่ อุณหภูมิ 45 และ 50 องศา ใช้เวลาเร็วกว่าคือ 1-2 วัน แต่เส้นใยเห็ดที่ได้มีลักษณะเป็นก้อนแข็งจนไม่สามารถนำบดเป็นผงเพื่อนำไปใช้สกัดสารประกอบต่อได้ ในขณะที่ทดลองพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารเหลว PDB ทุกครั้ง อาหารเหลว PDB จะมีลักษณะขุ่นเป็นตะกอน เส้นใยเห็ดไม่เจริญ (ภาพที่ 2) และสารที่ได้จากเห็ดไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria*spp. สาเหตุโรคพืช



ภาพที่ 1 ลักษณะเห็ด *Oudemansiella* spp. ที่เจริญอยู่ในอาหารเหลว PDB



ภาพที่ 2การปนเปื้อนของแบคทีเรียในขวดอาหารเหลว

การทดลองที่ 3.5.7 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก

ผลการทดลอง

วิธีที่ 1 การทดสอบวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมการเกิดโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* โดยกรรมวิธีการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น เมื่อตรวจสอบและบันทึกลักษณะอาการภายนอกที่เกิดกับใบและลำต้นเทียม หลังการปลูกเชื้อ 9 เดือน พบว่าต้นกล้วยส่วนใหญ่ในกรรมวิธีการใช้เชื้อ *T. harzianum* แสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล ส่วนยอดยังคงหลายใบยังคงมีสีเขียว ไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่ในกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อต้นกล้วยแสดง อาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล กาบใบด้านนอกหักพับ ใบยอดทั้งหมดที่เหลือเริ่มเหี่ยว

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ในการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำสุด คือ 1.95 และ 2.05 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดยกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 มีระดับอาการโรคภายใน 2.55 ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th2 และ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 2.85 และ 3.17 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ในการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำสุด คือ 1.53 และ 1.75 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดยกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 และ Th2 มีระดับอาการโรคภายใน 2.30 และ 2.50 ตามลำดับ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 2.75 (ตารางที่ 1)

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ในการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำสุด คือ 1.15 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th3 มีระดับอาการโรคภายใน 1.33 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 และ Th2 มีระดับอาการโรคภายใน 1.77 และ 1.85 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th4 ที่มีระดับอาการภายในต้น 2.25 (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ของกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 กับกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่า กรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อมีระดับอาการภายใน 5.85 ซึ่งเป็นระดับการเกิดอาการภายในต้นกล้วยที่สูงกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ทั้งในหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การทดสอบความสามารถสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 5 ไอโซเลท ในการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของกล้วยน้ำว้า

กรรมวิธี	ระดับการเกิดอาการภายในของต้นกล้วยเมื่ออายุ 9 เดือน [1/]			
	ความหนาแน่นของสปอร์แขวนลอย (สปอร์/มิลลิลิตร)			น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
	10^5	10^6	10^7	
T. harzianum Th1	2.55 b	2.30 b	1.77 c	-
T. harzianum Th2	2.85 c	2.50 b	1.85 c	-
T. harzianum Th3	2.05 a	1.75 a	1.33 b	-
T. harzianum Th4	3.17 c	2.75 c	2.25 d	-
T. harzianum Th5	1.95 a	1.53 a	1.15 a	
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	-	-	-	5.84
CV (%)	14.1	12.8	13.5	

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ หรือ 4 ต้น

[2/] ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 95% DMRT

ต้นทดลองปลูกในวงบ่อคอนกรีต

อาการภายนอกของกล้วยน้ำว้าที่เป็นโรคเหี่ยวจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

ระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

<u>วิธีที่ 2 การทดสอบวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมการเกิดโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้าที่ มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense*</u> โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T.*

harzianum ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ แต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 4 ต้น เมื่อตรวจสอบและบันทึกลักษณะอาการภายนอกที่เกิดกับใบและลำต้นเทียม หลังการปลูกเชื้อ 9 เดือน พบว่า ต้นกล้วยส่วนใหญ่ในกรรมวิธีการใช้เชื้อ *T. harzianum* แสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล ส่วนยอดยังคงหลายใบยังคงมีสีเขียว ไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่ในกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ต้นกล้วยแสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล กาบใบด้านนอกหักพับ ใบยอดทั้งหมดที่เหลือเริ่มเหี่ยว

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 50 กรัมพบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำสุด คือ 1.25 และ 1.32 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 มีระดับอาการโรคภายใน 1.55 ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th2 และ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 1.75 และ 1.87 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 100 กรัมพบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำสุด คือ 1.25 และ 1.32 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 ซึ่งมีระดับอาการโรคภายใน 1.35, 1.50 และ 1.45 ตามลำดับ ซึ่ง 3 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 150 กรัมพบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำสุด คือ 1.0 และ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 มีระดับอาการโรคภายใน 1.17 ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th2 และ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 1.25 และ 1.35 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 200 กรัมพบว่า ทุกกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำเท่ากันคือ 1.0 ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 5 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ของกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 กับกรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ พบว่า กรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อมีระดับอาการภายใน 6.24 ซึ่งเป็นระดับการเกิดอาการภายในต้นกล้วยที่สูงกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ทั้งในสัดส่วนเมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม (ตารางที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ในกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ในสัดส่วนเมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม พบว่า กรรม

วิธีการใช้เชื้อที่เลี้ยงในข้าวเปลือก ทำให้ระดับการเกิดโรคภายในลำต้นของกล้วยต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน และเมื่อใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตรา 200 กรัม เมื่อตรวจสอบแล้วไม่พบอาการของโรคภายในลำต้น หรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าหรือรอบๆ ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นกรรมวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกมาเป็นวิธีการในการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของกล้วยน้ำว้าที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดี มีแนวทางนำไปพัฒนาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้

ตารางที่ 2 การทดสอบความสามารถของเชื้อรา *T. harzianum* จำนวน 5 ไอโซเลท ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของกล้วยน้ำว้า

กรรมวิธี	ระดับการเกิดอาการภายในของต้นกล้วยเมื่ออายุ 9 เดือน [1/]				
	น้ำหนักของเมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อ *T. harzianum* (กรัม)				เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ *T. harzianum*
	50	100	150	200	
T. harzianum Th1	1.55 b	1.35 b	1.17 b	1.0	-
T. harzianum Th2	1.75 c	1.50 b	1.25 c	1.0	-
T. harzianum Th3	1.32 a	1.15 a	1.0 a	1.0	-
T. harzianum Th4	1.87 c	1.45 b	1.35 c	1.0	-
T. harzianum Th5	1.25 a	1.13 a	1.0 a	1.0	
เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ *T. harzianum*	-	-	-	-	6.24
CV (%)	12.2	11.9	7.2	0	-

[1/] ค่าเฉลี่ยจาก 4 ซ้ำ หรือ 4 ต้น

[2/] ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 95% DMRT

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ(Conclusion and Suggestion)

กิจกรรมย่อยที่ 3.1 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.1.1 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 แบบผงเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของมันฝรั่ง

สรุปผลการทดลอง

1. การพัฒนาสูตรผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* สายพันธุ์ DOA-WB4 เพื่อควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง โดยเพิ่มปริมาณบนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ผสมกับสารละลาย magnesium sulfate ความเข้มข้น 0.1M carboxymethylcellulose ความเข้มข้น 2.5% และสารตัวพาผงแป้งทัลคัม (talcum) ในอัตรา 1:4 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ได้ผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีปริมาณแบคทีเรีย $4.3x10^{10}$ หน่วยโคโลนี/กรัม โดยสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) ได้นาน 12 เดือน และเก็บรักษาในตู้เย็น (4-6 องศาเซลเซียส) ได้นาน 15 เดือน

2. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในโรงเรือนทดลอง พบว่าสัปดาห์ที่ 7 หลังการปลูกมันฝรั่ง ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวได้ 60 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณของ BS DOA-WB4 $3.5x10^{5}$ หน่วยโคโลนี/ดิน 1 กรัม

3. การทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาอัตราการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในสภาพแปลงทดลอง พบว่าการรด BS DOA-WB4 อัตรา 30, 40, 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร และการใส่ BS DOA-WB4 อัตรา 1 กรัม/ต้น ทุก 7 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ BS DOA-WB4 และการรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวได้ดีที่สุด จากนั้นทำการทดสอบวิธีการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงที่เหมาะสมในการควบคุมโรคเหี่ยว พบว่าการแช่หัวพันธุ์ การรองก้นหลุม และการคลุกหัวพันธุ์มันฝรั่งก่อนปลูก และรด BS DOA-WB4 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน สามารถลดการเกิดโรคได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ BS DOA-WB4 สรุปได้ว่าทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบสามารถทำให้มันฝรั่งในแปลงทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเหี่ยวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมซึ่งไม่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง

4. การทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่งในสภาพแปลงเกษตรกร พบว่าแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคเหี่ยว 76.5 เปอร์เซ็นต์ และแปลงเปรียบเทียบ (control) เป็นโรคเหี่ยว 83.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแปลงที่ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง เป็นโรคไม่แตกต่างจากแปลงเปรียบเทียบที่ไม่ได้ใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผง แสดงว่าการใช้ผลิตภัณฑ์ BS DOA-WB4 แบบผงในอัตราที่ทดสอบนี้ไม่สามารถควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียได้ เนื่องจากมีการระบาดของโรคเหี่ยวค่อนข้างรุนแรง และควรนำวิธีการเขตกรรม เช่นการไถดินตากแดด และการอบดินด้วยยูเรียปูนขาวมาใช้ก่อนการปลูกมันฝรั่งเพื่อฆ่าเชื้อในดินก่อนปลูกด้วย

การทดลองที่ 3.1.2 การพัฒนาผลิตภัณฑ์*Bacillus subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 แบบเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากแบคทีเรียของขิง

สรุปผลการทดลอง

การเตรียมผลิตภัณฑ์ *Bacillus. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 แบบเม็ด โดย ใช้ เกาลิน หรือดินขาวเป็นสารพา มีสูตรดังนี้ ดินขาว 400 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 80 มิลลิลิตร, sodium carboxymethyl cellulose (SCMC) 40 มิลลิลิตร และ กากน้ำตาล 40 มิลลิลิตร มีความสม่ำเสมอและการกระจายตัวของแบคทีเรีย *B. subtilis* สายพันธุ์ดินรากยาสูบ no.4 อยู่ที่ 10^{9} cfu/g ชีวภัณฑ์นี้

เก็บรักษาได้เป็นเวลา 12 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และ 15 เดือน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในเรือนทดลองได้ร้อยละ 60 และเมื่อนำมาใช้มาทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลองพบว่า อัตรา 2.0 กรัม/ต้นมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงทดลองได้ร้อยละ 79 และได้ผลผลิต 4,549 กิโลกรัม/ไร่ เมื่อนำชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดแบคทีเรีย *Bacillus. subtilis* สายพันธุ์ ดินรากยาสูบNo. 4 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในสภาพแปลงเกษตรกร ที่จังหวัดกาญจนบุรี พบว่าการใช้ชีวภัณฑ์ชนิดเม็ด อัตรา อัตรา 2.0 กรัม/ต้นมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงในแปลงเกษตรกรร้อยละ 73.28 และได้ผลผลิต 3,926 กิโลกรัมต่อไร่

การทดลองที่ 3.1.3 การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ *B. subtilis* (Bs) สูตรผง เพื่อใช้ควบคุมเชื้อรา *Alternaria brassicicola* โดยการทดสอบสารพาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาปริมาณ Bs พบว่า ถ้าทำการผสมปรุงแต่งแล้วนำไปใช้ทันที พบว่า การใช้ซีโอไลท์เป็นสารพามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้สูงสุด ส่วนการใช้สารทัลคัมเป็นสารพามีความเหมาะสมในการผสมปรุงแต่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเก็บผลิตภัณฑ์ไว้เป็นเวลานานมากกว่า 1 ปี เนื่องจากสามารถรักษาเซลล์ Bs ให้มีปริมาณคงเหลือได้ดีที่สุด ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคในพืชได้สูง และการละลายน้ำอยู่ในอัตราที่ดี ซึ่งจะทำให้ไม่มีการตกค้างในถังฉีดเมื่อนำไปพ่นบนพืช นอกจากนี้ทั้งทัลคัมและซีโอไลท์เป็นสารที่หาซื้อง่าย และราคาไม่แพง ดังนั้นจึงมีความหมาะสมในการนำไปใช้เป็นสารพาในการแปรรูปเป็นสารชีวภัณฑ์

กิจกรรมย่อยที่ 3.2 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus spp* ในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.2.1การคัดเลือกและทดสอบสายพันธุ์ Bacillus ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora parasitica*

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำหน้าวัวจำนวน 85 ไอโซเลท พบว่า มี 15 ไอโซเลท ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำของหน้าวัวบนอาหาร PDA และ มี 3 ไอโซเลท ได้แก่ 17G15 GM011 และ 22W11 ที่มีศักยภาพในการลดการเกิดโรคเน่าดำของหน้าวัวในระดับโรงเรือน โดยสามารถลดอาการแผลเน่าบนใบหน้าวัวได้ประมาณ 15 % เมื่อเปรียบเทียบกับใบหน้าวัวที่ไม่มีการพ่นด้วย Bacillus เพื่อป้องกันการเกิดโรค ในการทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ จำนวน 110 ไอโซเลท พบว่า มี Bacillus 73 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* บนอาหาร PDA และไอโซเลท 19W123 และ 8W14 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ในระดับโรงเรือน ได้ดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus แต่ทั้งนี้ ทุกไอโซเลทมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเน่าดำกล้วยไม้ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus การทดสอบศักยภาพของแบคทีเรีย Bacillus ในการควบคุมโรคเน่าดำสับประรด จำนวน 120 ไอโซเลท พบว่า มี Bacillus 77 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *P. parasitica* สาเหตุโรคเน่าดำสับประรด การทดสอบประสิทธิภาพของ Bacillus 5 ไอโซเลท ในการควบคุมโรคเน่าดำบนต้นสับประรด ในโรงเรือนทดสอบ พบว่า Bacillus ทุกไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่แตกต่างกัน และเทียบเท่ากับการพ่นด้วยสารmetalaxyl 25% WP โดย ไอโซเลท 20W32 มี

ประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุโรคเน่าดำของสับประรด และดีกว่ากรรมวิธีที่ไม่มีการพ่น Bacillus แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 3.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Erwinia carotovora subsp. carotovora และ E. chrysanthemi สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้

สรุปผลการทดลอง

ในอนาคตผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น จากเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 70 ไอโซเลท ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละในกล้วยไม้สกุลหวาย Ecc และ Ech ไอโซเลท EcK3 และ PA334 ตามลำดับ ซึ่งผ่านการทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรครุนแรงสูงสุด พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ 19 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ไอโซเลทดังกล่าว และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย 19 ไอโซเลท มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech กับไอโซเลทที่มีความรุนแรงในการก่อให้เกิดโรคเน่าเละรองลงมา พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ 5 ไอโซเลท ได้แก่ BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 มีประสิทธิภาพสูงสุดและสามารถยับยั้งแบคทีเรีย Ecc และ Ech ได้ดีทุกไอโซเลท

จากการทดสอบอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคและวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุโรคบนกล้วยไม้สกุลหวาย ด้วยวิธีการ spray เชื้อสาเหตุโรคที่ผสมผง carborundum เปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อโดยวิธีใช้เข็มทำแผลบนใบกล้วยไม้ก่อนการ spray ด้วย bacterial suspension พบว่า การปลูกเชื้อโดยการทำแผลเป็นวิธีปลูกเชื้อดีที่สุด และอัตราความเข้มข้นของเชื้อสาเหตุโรคเหมาะสมที่สุด คือที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^8 cfu/ml ซึ่งมีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคเร็วที่สุดภายในเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียปฏิปักษ์ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech ในสภาพโรงเรือน พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้ทั้ง Ecc และ Ech ส่วน ไอโซเลท 17W18 ไม่สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc ได้ เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเชื้อแบคทีเรีย Ecc และ Ech พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ คือ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 สามารถควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ech ได้ดีกว่า Ecc

การควบคุมเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ในสภาพสวนโดยวิธีธรรมชาติ คือไม่ทำแผล นั้น เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BK2, BK5, BK9, BK12 และ 17W18 สามารถควบคุมการเกิดโรคเน่าเละได้ผลดีกว่าการทำแผล ซึ่งสภาพการเกิดโรคในสภาพจริงก็เป็นเช่นนี้ ส่วนกรณีที่มีการทำแผล เป็นการตั้งใจให้เกิดโรค คือ เชื้อโรคจะเข้าทางบาดแผลและทำให้เกิดอาการเน่าเละ จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไม่สามารถควบคุมได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพ ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย Ecc หรือ Ech สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้ พบว่า เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากบริเวณผิวใบ ในสวนของเกษตรกรที่จังหวัดกาญจนบุรี ไอโซเลท BK2, BK5, BK9 และ BK12 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคได้ดี โดยเฉพาะไอโซเลท BK12 และอีก 1 ไอโซเลทจากศูนย์เก็บเชื้อ culture collections คือ ไอโซเลท 17W18 ก็สามารถควบคุมโรคเน่าเละได้เช่นกัน

การทดลองที่ 3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุม เชื้อรา Rhizoctonia solani

สรุปผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างกาบใบข้าวโพดที่แสดงอาการไหม้หรือจุดมาทำการแยกเชื้อและศึกษาเชื้อที่แยกได้ พบว่าคือ *Rhizoctonia solani* นำเชื้อที่แยกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *R. solani* ในห้องปฏิบัติการกับจุลินทรีย์จากหน่วยเก็บจุลินทรีย์โรคพืช จำนวน 181 isolate บนอาหาร PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ จำนวน 13 ไอโซเลท แสดงปฏิกิริยายับยั้งเชื้อ *R. solani* หลังการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 2 วัน นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* จำนวน 13 ไอโซเลท นำไปทดสอบในเรือนเพาะชำที่มีการปลูกเชื้อให้กับพืชอาศัยของเชื้อรา *R. solani* จากการประเมินการเกิดโรคครั้งที่ 5 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ระหว่าง 29.6-55.6 คัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* จำนวน 7 ไอโซเลท นำไปทดสอบในแปลงทดลองพบว่ากรรมวิธีพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 13 (20 W 7) มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุดคือ 17.02 ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 3 (XM40), 4 (14 G 12), 6 (18 G 6), 7 (C B 7), 8 (14 W 8) และ 10 (11 W 1) เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 22.81, 22.95, 22.97, 21.61, 23.01และ 23.37 ตามลำดับ แต่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 31.61 กรรมวิธีพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ isolate ที่ 3 (XM40), 4 (14 G 12), 6 (18 G 6), 7 (C B 7), 8 (14 W 8) และ 10 (11 W 1) ไม่แตกต่างจากกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า จากผลการทดลองที่ได้ควรทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลและเป็นการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน

การทดลองที่ 3.2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริก สาเหตุจากเชื้อรา *Colletrotrichum gloeosporioides*

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง สรุปได้ว่า การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ทั้ง 5 ไอโซเลท โดยการพ่นด้วย cell suspension ของ *Bacillus* spp. ในแปลงปลูกพริก ที่ อ. ท่าม่วง จ. กาญจนบุรี พบว่า *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดการเกิดโรคแอนแทรคโนส สาเหตุจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในการทดสอบประสิทธิภาพในรูปสารชีวภัณฑ์ สูตรผง พบว่า ไอโซเลท 20 W33 ที่อัตรา 50 กรัมต่อน้ำ20ลิตร สามารถลดการเกิดโรคได้สูงสุดเท่ากับ 59% และ *Bacillus* spp. ไอโซเลท B 23 ที่อัตรา 30-50 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร สามารถลดการเกิดโรคได้ 55-68 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่มีการพ่นด้วยสารชีวภัณฑ์ *Bacillus* spp. และการแช่ผลพริกหลังเก็บเกี่ยวด้วยสารละลายชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 ที่อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที สามารถลดการเกิดโรคที่ติดมากับผลพริกได้ 30 % เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่แช่ด้วยน้ำเปล่า นอกจากนี้การคลุกเมล็ดที่ติดเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยสารชีวภัณฑ์ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 อัตรา 50 กรัมต่อเมล็ด 1 กิโลกรัม สามารถลดปริมาณเชื้อราที่ติดเมล็ดได้ถึง 51% ซึ่งสูงกว่าการคลุกด้วยสารคาร์บ็อกซิน 75% WP ซึ่งสามารถลดปริมาณเชื้อราได้ 45.7%

เนื่องจาก *Bacillus* spp. ไอโซเลท B23 จำเป็นต้องมีการทดลองซ้ำอีก 1 ฤดู เพื่อยืนยันผลการทดลองและตรวจวินิจฉัยสปีชี่สก่อนที่จะนำไปพัฒนาต่อ ดังนั้น *B. subtilis* ไอโซเลท 20W33 และ 20W16 จึงเป็นไอโซเลทที่จะนำไปพัฒนาเพื่อเป็นสารชีวภัณฑ์ควบคุมโรคแอนแทรคโนสพริกในขณะนี้

การทดลองที่ 3.2.5 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคพืช

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ที่เก็บรักษาไว้ที่หน่วยเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทางการเกษตร กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวน 107 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum capsici* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก โดยวิธี dual culture technique พบว่ามีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ B23/2, 20W15, 20W19 และ 19W6 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C capsici* ได้ 58.80 51.03 50.69 และ 51.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* ในปลูกพืชเรือนทดลอง เมื่อทำการปลูกเชื้อ *C. capsici* สาเหตุโรคบนผลพริก และพ่น *B. subtilis* B23/2, 20W15, 20W19 และ 19W6 ตามกรรมวิธีที่กำหนด พบว่า ทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำเกินไป ทำให้ไม่สามารถสรุปความแตกต่างระหว่างกรรมวิธีได้

การทดลองนี้ควรจะทำการทดลองซ้ำต่อไปอีก ให้ได้ข้อมูลมากพอที่จะคัดเลือกสายพันธุ์*Bacillus subtilis* ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกที่เกิดจากเชื้อรา *C. capsici* เพื่อการนำไปใช้ทดสอบในแปลงทดลองและพัฒนารูปแบบการนำไปใช้ต่อไป

การทดลองที่ 3.2.6 การควบคุมโรคเหี่ยวเขียวของพริกโดยแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพของผงสำเร็จอย่างง่ายของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของพริกในสภาพแปลงทดลอง ในปี 2557 พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no. 2, UB no.25 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 15 วัน และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นโรคเหี่ยว 9.2, 10.0, 9.2, 11.7 และ 10.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในปี 2558 พบว่ากรรมวิธีที่รดด้วยผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ดินรากยาสูบ no.4, DOA-WB4, UB no. 2, UB no.25 อัตรา 50 กรัม/น้ำ 20 ลิตรทุก 15 วัน และกรรมวิธีควบคุมที่ไม่รดผงสำเร็จแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* เป็นโรคเหี่ยว 7.5, 5.0, 6.25, 5.0 และ 3.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 5 กรรมวิธีพริกเป็นโรคเหี่ยวไม่แตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกับปี 2557 และทั้ง 2 ปี พริกเป็นโรคน้อยมากทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่นำมาทดสอบมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum*

การทดลองที่ 3.2.7 การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคเหี่ยวพืชตระกูลแตงที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium solani*

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบการผลของเชื้อ *B. subtilis* จำนวน 10 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA ทดสอบโดยวิธี Dual plate technique พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ที่นำมาทดสอบ สามารถสร้าง inhibition zone หรือพื้นที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* บนอาหาร PDA ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท แต่มีระดับความกว้างของพื้นที่แตกต่างกันจากมากไปหาน้อย คือ ไอโซเลท 17G18, 22W10, 20W12, 20W16, 17G15, 20W5, 20W4, 2G4, 19W42 และ 20W8 เท่ากับ

1.23, 1.14, 1.10, 1.08, 1.03, 0.94, 0.82, 0.81, 0.76 และ 0.65 เซนติเมตร ตามลำดับ จึงได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ไอโซเลท 17G18, 22W10, 20W12, 20W16 และ 17G15 ไปทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการ soil infestation ต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพโรงเรือน ด้วยวิธีการ soil infestation พบว่า ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของเชื้อ *B. subtilis* ในอัตรา 100 มิลลิลิตรต่อกระถาง กรรมวิธีการราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 17G15, 17G18, 20W12, 20W16, 22W10 มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 25.30, 3.50, 12.30, 96.30 และ 87.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีไม่ได้คลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* ไม่พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก โดยมีความงอกเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบเมล็ดแตงกวาที่ไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์ หรือต้นแตงกวาที่งอกได้แสดงอาการเหี่ยวตายทั้งหมด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* 5 ไอโซเลท ในการยับยั้งการเกิดโรคเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวาที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. solani* หลังการทดลอง 21 วัน พบว่ากรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 17G18 มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยทำให้จำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 3.50 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* อีก 4 ไอโซเลท ขณะที่ กรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 มีประสิทธิภาพรองลงมา โดยมีจำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 12.30 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* อีก 3 ไอโซเลท ส่วนกรรมวิธีการราด *B. subtilis* ไอโซเลท 17G15 มีจำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 25.30 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ไอโซเลท 20W16 และ 22W10 ที่มีจำนวนแตงกวาแสดงอาการต้นเหี่ยว 96.30 และ 87.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. subtilis* ในการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของพืชตระกูลแตงที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก พบว่า เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก พบว่า ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงกวา ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.30, 5.30 และ 5.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 25.30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นแตงกวาที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของแตงโมที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก พบว่า ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดแตงโม ในดินที่คลุก

ด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.75, 5.45 และ 5.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 27.50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นแตงโมที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์คือ *B. subtilis* ในการการควบคุมการเกิดโรคเหี่ยวของมะระที่เกิดจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก ด้วยวิธีการ soil infestation โดยนับจำนวนต้นแตงกวาที่มีอาการเหี่ยวหรือไม่งอก พบว่า ในวันที่ 21 หลังเลี้ยงปลูกเมล็ดมะระ ในดินที่คลุกด้วยเชื้อรา *F. solani* แล้วราดด้วย cell suspension ของแบคทีเรีย *B. subtilis* ในอัตรา 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 4.50, 5.10 และ 5.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) ที่มีจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 26.30 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ กรรมวิธีที่ดินไม่ได้คลุก *F. solani* และไม่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* และกรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor ไม่พบจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือ แสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วน กรรมวิธีคลุกดินปลูกด้วยเชื้อรา *F. solani* ราดด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ พบจำนวนต้นมะระที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกรรมวิธีการราดเชื้อ *B. subtilis* ทั้งหมดในการยับยั้งหรือลดจำนวนต้นเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวา แตงโม และมะระ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. solani* ในสภาพแปลงปลูก หลังการทดลอง 21 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* BS1 (17G18) กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) และ กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) เป็นกรรมวิธีที่มีประสิทธิภาพดี โดยกรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS1 (17G18) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.30, 5.75 และ 4.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS3 (สายพันธุ์การค้า 1) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.30, 5.45 และ 5.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS4 (สายพันธุ์การค้า 2) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 5.75, 5.50 และ 5.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ BS2 (20W12) มีจำนวนต้นแตงกวา แตงโม และมะระ แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก 25.30, 27.50 และ 26.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กรรมวิธีที่ราดด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา Terraclor เป็นกรรมวิธีการยับยั้งหรือลดจำนวนต้นเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวา แตงโม และมะระ โดยไม่พบจำนวนต้นพืชตระกูลแตงทั้ง 3 ชนิด ที่แสดงอาการโรคเหี่ยวหรือไม่งอก หรือแสดงอาการโรค 0 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กรรมวิธีที่ราดด้วยเชื้อ *B. subtilis* BS1 (17G18) มีศักยภาพที่ดีในการเป็นตัวเลือกในการยับยั้งหรือลดจำนวนต้นเหี่ยวหรือไม่งอกของแตงกวา แตงโม และมะระ ที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. solani* ในระดับแปลงปลูกต่อไป

กิจกรรมย่อยที่ 3.3 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.3.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Didymella bryoniae* (Auersw.) Rehm. สาเหตุโรคยางไหล

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างแตงกวา แตงร้าน แตงแคนตาลูป และแตงเมล่อนที่แสดงอาการของโรคยางไหล ที่แปลงเกษตรกร จ.สุพรรณบุรี สระแก้ว และพะเยา และสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ในปี 2554 – 2555 พบว่า สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากส่วนของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท และแยกได้จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ในปี 2554 ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จาก culture collection จำนวน 40 ไอโซเลท และ เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่แยกได้จากส่วนของพืช จำนวน 14 ไอโซเลท รวม 54 ไอโซเลท ผลการทดลองในปี 2554 สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยการวัดขนาดการสร้าง clear zone ที่กว้างของเชื้อแต่ละไอโซเลท และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีทั้งหมด 34 ไอโซเลท

ในปี 2555 ได้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์จากดิน จำนวน 80 ไอโซเลท ผลการทดลอง พบว่า สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคโดยการวัดขนาดการสร้าง clear zone ที่กว้างของเชื้อแต่ละไอโซเลท และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อสาเหตุได้ดีทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีทั้งหมด 64 ไอโซเลท

ดังนั้นจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรค 3 ไอโซเลท ทั้งหมด 134 ไอโซเลท สามารถคัดเลือกได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดี จำนวน 98 ไอโซเลท ซึ่งในเบื้องต้นจะนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 14 ไอโซเลท ไปทดสอบประสิทธิภาพต่อในสภาพโรงเรือนทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3.3.2 การคัดเลือกและทดสอบเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการ เชื้อรา *Didymella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในสภาพแปลงทดลอง

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อรา *Dydimella bryoniae* สาเหตุโรคยางไหลในแตงเมล่อน ในสภาพแปลงทดลองเกษตรกร ที่ จ. สุพรรณบุรี จำนวน 2 แปลงทดลอง โดยทำการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกได้จากในสภาพห้องปฏิบัติการ และ สภาพโรงเรือน จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท BSS32, BSS37, BSS65 และ AS013 ที่คัดเลือกจาก culture collection ด้วยวิธีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลทลงดิน ในอัตรา 3 กรัมสลับกับการพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ อัตรา 40 กรัมต่อน้ำ 20 ลิตร ทุก 7 วัน ทั้งหมด 4 ครั้ง จากการประเมินความรุนแรงของโรคก่อนและหลังการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ผลการทดลองในแปลงทดลองที่ 1 พบว่า ทุกกรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลท มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคน้อยกว่ากรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกรรมวิธีพบว่า ไอโซเลทที่มีค่าเฉลี่ยความรุนแรงของโรคยางไหลต่ำสุด ได้แก่ ไอโซเลท BSS32 ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 1.96 ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลท BSS37, BSS065 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 2.80, 2.56 และ 2.41

ตามลำดับ และทุกกรรมวิธีที่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 3.05

การทดลองในแปลงที่ 2 พบว่ามีผลการทดลองที่สอดคล้องกัน ซึ่งจากการทดลองพบว่า ค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคในทุกกรรมวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลท BSS32, BSS37, BSS65 และ AS013 มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหล เท่ากับ 2.09, 2.13, 2.10 และ 2.19 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในแต่ละกรรมวิธี แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีค่าเฉลี่ยระดับความรุนแรงของโรคยางไหลเท่ากับ 3.09

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนผลผลิตและน้ำหนักผลผลิตรวมที่ได้จากผลการทดลองทั้ง 2 แปลงทดลองก็พบว่า กรรมวิธีที่มีการใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ มีการควบคุมโรคได้ดี มีจำนวนผลผลิตและน้ำหนักรวมของผลผลิตดีกว่ากรรมวิธีไม่ใส่เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 2 แปลงทดลอง จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพทั้ง 4 ไอโซเลท ไปใช้ในการพัฒนาเป็นสารชีวภัณฑ์ ในการป้องกันกำจัดโรคยางไหลของพืชตระกูลแตงโดยชีววิธี ซึ่งในการศึกษาต่อไปนั้น จะได้มีการพัฒนารูปแบบของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ เพื่อผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคโดยชีววิธีที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การทดลองที่ 3.3.3 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมแบคทีเรีย *Burkholderia gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้

สรุปผลการทดลอง

ทดสอบคุณสมบัติการเป็นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีแนวโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* ด้วยวิธี disc diffusion พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้จำนวน 27 ไอโซเลท และคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. gladioli* จำนวน 5 ไอโซเลท เพื่อใช้ทดสอบในสภาพเรือนทดลอง พบว่ากรรมวิธีพ่นเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ BS5 BS23 และ BS40 สามารถควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ได้ดี มีระดับความรุนแรงของโรคแตกต่างจากกรรมวิธีพ่นด้วยน้ำเปล่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เบื้องต้น พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* สำหรับเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อ *B. gladioli* สาเหตุโรคเน่าสีน้ำตาลของกล้วยไม้ในเรือนทดลองแล้วจะนำไปทดสอบในสภาพแปลงเกษตรกรต่อไป

การทดลองที่ 3.3.4 การควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาลของกล้วยไม้ด้วยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

สรุปผลการทดลอง

ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดสีน้ำตาล ในระดับโรงเรือนปลูกพืชทดลอง จำนวน 3 ไอโซเลท จากผลการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและการตรวจด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป api 50 CHB พบว่าเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

การทดลองที่ 3.3.5 การศึกษาการป้องกันกำจัดเชื้อ Rhizoctonia solani โดยชีววิธี

สรุปผลการทดลอง

ทดสอบประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 7 ไอโซเลทในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *R.* ในแปลงทดลอง โดยมีกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ โดยการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จำนวน 4 ครั้ง ประเมินการเกิดโรคก่อนพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ โดยครั้งแรกเริ่มประเมินก่อนพ่นครั้งที่ 2 7 วัน จากนั้นประเมินก่อนพ่นเชื้อทุกครั้ง และหลังพ่นครั้งสุดท้าย 7 วัน ผลการทดลองในแปลงที่ 1 พบว่าจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ 3 ไอโซเลท คือ 20 W 7, 14 W 8 และ XM 40 มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 29.86, 30.60 และ 30.82 ตามลำดับ กรรมวิธีพ่นน้ำเปล่ามีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 34.03 นำจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ทั้ง 3 ไอโซเลทไปทดสอบเพิ่มเติมในแปลงทดลองที่ 2 โดยเพิ่มความเข้มข้น และระยะเวลาพ่นเป็นทุก 5 วัน พบว่าหลังการพ่นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ครั้งสุดท้าย 5 วัน พบว่าไอโซเลท 20 W 7 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคต่ำที่สุด คือ 20.17 ไม่แตกต่างทางสถิติกับไอโซเลท 14 W 8 อัตรา 60 กรัม/ 20 ลิตร ไอโซเลท 14 W 8 อัตรา 80 กรัม/ 20 ลิตร และสารเปรียบเทียบ pyraclostrobin 25% W/V อัตรา 15 มล./ 20 ลิตร มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 21.80, 22.77 และ 27.68 ตามลำดับ แต่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า มีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 35.00

กิจกรรมย่อยที่ 3.4 การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยโรคพืช

การทดลองที่ 3.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria penetrans* ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne* spp

สรุปผลการทดลอง

ในการทดลองนี้สามารถรวบรวมแบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. penetrans* ไอโซเลตไทยจากหัวมันฝรั่ง มันขี้หนูและรากพริก และทดสอบความสามารถในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* ในการทดลองในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 นิ้ว บรรจุดิน 200 กรัม โดยการคลุกดินด้วยสปอร์อัตรา 10^6 สปอร์/กระถาง พบว่าบางไอโซเลตสามารถลดการสร้างกลุ่มไข่ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ แต่ประชากรตัวอ่อนระยะที่สองในดินไม่แตกต่างกับกรรมวิธีควบคุม แบคทีเรียปฏิปักษ์ *P. penetrans* ทุกไอโซเลตสามารถเข้าทำลายและครบวงชีวิตและสร้างสปอร์ในไส้เดือนฝอยรากปม การใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม อาจเหมาะสำหรับการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในระยะยาวเมื่อปริมาณสปอร์ของแบคทีเรียในดินสะสมจนมีปริมาณมากพอ การใช้แบคทีเรียหลายไอโซเลตร่วมกันอาจมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีความจำเพาะกับไส้เดือนฝอยรากปมค่อนข้างสูง ซึ่งในสภาพธรรมชาติจะมีไส้เดือนฝอยรากปมหลายชนิดอยู่ปะปนกัน การใช้แบคทีเรีย *P. penetrans* ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมควรใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ ด้วย เนื่องจากอาจมีไส้เดือนฝอยรากปมบางส่วนที่หลุดรอดจากการเข้าทำลายของแบคทีเรีย สามารถครบวงชีวิตและขยายพันธุ์ได้เป็นปกติ จึงควรมีการทดลองการใช้แบคทีเรียชนิดนี้ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในระยะยาว และการใช้ร่วมกับวิธีการอื่นๆ เพื่อให้ได้วิธีการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมที่มีประสิทธิภาพต่อไป

การทดลองที่ 3.4.2 การคัดเลือกแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus* spp

สรุปผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างดินรวม 278 ตัวอย่าง ระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงกันยายน 2558 เพื่อตรวจหาแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ในไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus* spp. ผลการตรวจยังไม่พบแบคทีเรีย *Pasteuria* spp. ในทุกตัวอย่าง

กิจกรรมย่อยที่ 3.5 การผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมโรคพืช

การทดลองที่ 3.5.1 การคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*

สรุปผลการทดลอง

จากการดำเนินงานในการการคัดเลือกเชื้อราเอ็นโดไฟท์ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* นั้นจากการทดสอบในสภาพโรงเรือน สามารถคัดเลือก ได้ 5 ไอโซเลท จากที่แยกได้ทั้งหมด 91 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเกิดโรคให้อยู่ในระดับความรุนแรงในระดับ ที่ 2 และ 3 แต่ผลอาจจะไม่แตกต่างจากชุดควบคุมมากนักซึ่งอาจเป็นผลมาจากวิธีการปลูกเชื้อสาเหตุลงบนต้นพริก และช่วงที่ทำการทดลองนั้นเป็นช่วงที่มีฝนตกชุก ความชื้นสูง ซึ่งเป็นสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเกิดโรค แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเชื้อราเอนโดไฟท์ ซึ่งในการศึกษาในครั้งต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงในเรื่องของวิธีการปลูกเชื้อให้มีความเหมาะสมมากกว่านี้

การทดลองที่ 3.5.2 การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินและพืช 4 วิธีคือ การแยกเชื้อราจากกลุ่มไข่ ไข่ เต็มวัยเพศเมียและตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม โดยการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ถึง 156 ไอโซเลท เป็นเชื้อรา 2 ชนิด (species) 8 สกุล (genera) ได้แก่เชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Paecilomyces lilacinus* สกุล *Trichoderma* sp. *Monacrosporium* sp. *Aspergillus* sp. *Penicillium* sp. *Fusarium* sp. *Verticillium* sp. *Paecilomyces* sp. *Anthrobotrys* sp. และเชื้อราอื่นที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ ซึ่งในการทดลองนี้ควรจะเพิ่มในส่วนของการแยกเชื้อราโดยเฉพาะการแยกเชื้อโดยตรงจากส่วนของพืชที่เป็นโรคเข้ามาเพิ่มเติม เพื่อให้ได้เชื้อราในกลุ่ม Endoparasitic fungi และส่วนตัวอย่างพืชควรเพิ่มชนิดของวัชพืชให้หลากหลายมากขึ้นเพื่อเพิ่มความหลากหลายของเชื้อรา ในการแยกเชื้อราจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปม และการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปมได้ดีแล้ว ส่วนการแยกเชื้อราจากไข่และตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปม ต้องพัฒนาทักษะและปรับปรุงวิธีการให้ดีขึ้น เนื่องจากการแยกจากตัวอ่อนระยะที่ 2 ของไส้เดือนฝอยรากปมนั้นใช้ดินเป็นองค์ประกอบของวิธีการซึ่งสามารถแยกเชื้อราที่อาศัยในดินรวมมาด้วย การการแยกจากกลุ่มไข่โดยตรง นั้นสามารถแยกเชื้อราได้มากว่าจากไข่เดี่ยวๆของไส้เดือนฝอยรากปมอาจเพราะขั้นตอนการละลายเมือกหุ้มถุงไข่ เก็บ suspension เกิดการปนเปื้อนมาก ส่วนการแยกเชื้อราจากตัวเต็มวัยเพศเมียของไส้เดือนฝอยรากปมในการทดลองนี้ยังไม่สามารถทำได้

การทดสอบศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ของไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ได้เชื้อราปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (*Meloidogyne* sp.) โดยใช้เชื้อรา *Fusarium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 *Verticillium* sp. ไอโซเลท ที่ 1 และ 2 และ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 1 -2 ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 6 ใส่ *Anthrobotrys* sp. ไอโซเลท ที่ 2 ให้ผลดีทั้งในการลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศซึ่งกรรมวิธีอื่นๆไม่สามารถลดจำนวนไส้เดือนฝอยรากปมในดินและกลุ่มไข่ในรากมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

การใช้เชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคเชื้อราบางชนิดอาจจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อต้นพืชอาศัยด้วยเช่นกัน และแม้ว่าในการทดลองนี้จะได้เชื้อราปฏิปักษ์หลายไอโซเลท แต่ยังไม่สามารถทดศักยภาพของเชื้อราปฏิปักษ์ในการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมได้ทุกไอโซเลทซึ่งจะนำมาทดสอบศักยภาพในเวลาอันเหมาะสมต่อไป

การทดลองที่ 3.5.3 การคัดเลือกและทดสอบศักยภาพของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคพืช (non-pathogenic *Fusarium*) ในการควบคุมเชื้อรา *Fusarium oxysporum*

สรุปผลการทดลอง

การออกสำรวจและเก็บตัวอย่างดิน จากแหล่งปลูกพืชต่าง ๆ ได้แก่ กล้วยน้ำว้า แก้วมังกร ข้าวโพด คะน้า แตง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ นำตัวอย่างดินมาแยกเชื้อราด้วยวิธี soil dilution plate technique บนอาหาร PDA แล้วทำเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single–spore technique บนอาหาร WA จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อราที่พบ พบว่าเชื้อราที่ได้คือ เชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) ซึ่งแยกได้จากดินปลูก 10 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด คะน้า แตง เบญจมาศ พริก ผักหวานบ้าน มะเขือเทศ ปาล์มน้ำมัน โหระพา และดินตามป่าธรรมชาติ จาก 15 จังหวัด เชื้อรา *F. oxysporum* ที่เก็บรวบรวมได้ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) มีลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหาร PDA และ ลักษณะสัณฐานวิทยาบนอาหาร CLA ที่คล้ายกัน

การตรวจสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรคของเชื้อรา *F. oxysporum* โดยปลูกเชื้อรา *F.* ทั้ง 35 ไอโซเลท (FO1 – FO35) แยกได้จากดินปลูกพืชและดินตามป่า บนต้นพืช จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ ตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า หลังจากย้ายต้นพืชลงปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน เชื้อรา *F. oxysporum* ส่วนใหญ่ทำให้กล้วยน้ำว้า ข้าวโพด แตงกวา เบญจมาศ ปาล์มน้ำมัน พริก ผักหวานบ้าน และมะเขือเทศ แสดงอาการใบล่างเริ่มเหี่ยว กลายเป็นสีเหลืองในวันต่อไป และหลังจากวันที่ 45 เป็นต้นไปใบที่เหลืองจะแห้ง ฟุบตัว ขณะเดียวกันใบด้านบนใบอื่น ๆ ก็เริ่มต้นอาการโรคในลักษณะเดียวกัน เมื่อผ่าดูด้านในต้นพืชที่เป็นโรค พบท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาลดำ และร่วง ขณะที่ต้นพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา *F. oxysporum* และต้นพืชที่ใช้ชิ้นวุ้น PDA แทนเชื้อรา มีการเจริญเป็นปกติ ไม่พบอาการเหี่ยวของใบหรือต้น และไม่พบอาการเน่าภายในท่อลำเลียงของพืช มีเชื้อรา *F. oxysporum* จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ FO4, FO5, FO6, FO12, FO23, FO34 และ FO35 ที่ไม่ทำให้พืชทดสอบ 8 ชนิด เกิดอาการโรคเหี่ยวหรืออาการท่อลำเลียงเน่าเป็นสีน้ำตาล

เมื่อนำเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic *Fusarium*) มาศึกษาผลที่มีต่อการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ด้วยวิธี Dual culture technique บ่มเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 28 $^{\circ}$ซ พบว่า เชื้อราทั้ง 2 กลุ่มเจริญบนอาหาร PDA ได้ดี โดยเจริญคลุมกัน ไม่มีการแบ่งพื้นที่การยับยั้งการเจริญ จึงทำให้วิเคราะห์

และเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีต่อเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศบนอาหาร PDA ไม่ได้

หลังจากย้ายต้นพืชปลูกเชื้อลงในกระถางดิน 35 วัน ทำการตรวจสอบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ และการเกิดโรค พบว่า ต้นมะเขือเทศ ในกรรมวิธีที่ 1 -7 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) และกรรมวิธีที่ 8 (ต้นมะเขือเทศ + ดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) + ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีการเจริญเติบโต ไม่ดีคล้ายกัน โดยอาการเหี่ยวของต้น เริ่มจากใบเหลืองตั้งแต่ใบล่าง แล้วทยอยเหลือง ตั้งแต่เดือนแรกที่ปลูกเชื้อ จนทั้งเหี่ยวทั้งต้นภายในเวลา 2 เดือน เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในลำต้น พบว่า เนื้อเยื่อในท่อลำเลียงมีอาการเน่าเป็นสีน้ำตาลดำทุกต้น โดยต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เมื่อเทียบระดับการเกิดโรคในต้นมะเขือเทศกรรมวิธีที่ 9 (ต้นมะเขือเทศ + ไม่คลุกดินคลุกเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) +ไม่คลุกเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค) ซึ่งมีระดับ 1 เป็นระดับการเกิดโรคต่ำ อย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 1 -8 ขณะที่การเจริญของต้นมะเขือเทศในกรรมวิธีที่ 9 มีการเจริญเติบโตดี มียอดแตกใบดี ไม่พบใบเหลืองหรือเหี่ยว

จากผลการทดลองที่พบว่า กรรมวิธีที่ 1 -7 และกรรมวิธีที่ 8 ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ มีระดับการเกิดโรคภายในต้น 3 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* หรือการทำให้เกิดโรคเหี่ยวบนต้นมะเขือเทศได้ อย่างไรก็ตาม หากได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินธรรมชาติหรือดินปลูกพืชให้มากขึ้น คาดว่าคงได้พบเชื้อรา *F. oxysporum* สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ในที่สุด

การทดลองที่ 3.5.4 การคัดเลือกเชื้อรา *Trichoderma harzianum*ที่มีศักยภาพ ในการ ควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola*

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าเชื้อรา *T. harzianum* จากดินไอโซเลทดินปลูกมะละกอแปลงพืชสวนศรีสะเกษ ให้ผลในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าได้ดีกว่ากรรมวิธีอื่นๆ เมื่อเทียบกับกรรมวิธีพ่นน้ำเปล่า แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สามารถใช้เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์สำหรับโรคใบจุดคะน้าที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ แต่จากการทดลองพบว่าระดับการเกิดโรคใบจุดคะน้าที่เชื้อรา *T. harzianum* สามารถช่วยลดการเกิดโรคลงมีผลลดลงไม่มากนัก และทุกกรรมวิธีมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคใกล้เคียงกัน ดังนั้นหากจะนำเชื้อรา *T. harzianum* มาใช้ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า การพ่นทุก 7 วัน อาจไม่สามารถเพิ่มผลผลิตคะน้าที่ไม่เป็นโรคได้มากนัก ดังนั้น หากมีการศึกษาพัฒนาวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ให้เหมาะสมอาจเพิ่มประสิทธิภาพการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการป้องกันกำจัดโรคใบจุดคะน้า ที่เกิดจากเชื้อรา *A. brassicicola* ได้ดีขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้ ใช้เป็นข้อมูลไปศึกษาถึงวิธีการที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบจุดคะน้าให้ได้ผลมากขึ้นต่อไป

การทดลองที่ 3.5.5 การคัดเลือกเชื้อรา *Oudemansiella* spp. ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อราสกุล *Colletotrichum gloeosporioides* และ *C. capsici* ในพริก

สรุปผลการทดลอง

ไอโซเลทเห็ด *Oudemansiella* spp. ที่เหมาะสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ รา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคของในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่าไอโซเลท L3P สามารถยับยั้งการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคบนอาหาร PDA โดยเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคมีการเจริญผิดปกติเห็นได้ชัดเจนกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองกับไอโซเลท ชช17, หนาว และสุ ราษฎร์และอุณหภูมิเหมาะสมที่ใช้อบแห้งเส้นใยเห็ด *Oudemansiella* spp. คือ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

การทดลองที่ 3.5.6 ทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจาก*Oudermansiella*spp. ต่อการเจริญของรา *Alternaria* spp. สาเหตุโรคพืช

สรุปผลการทดลอง

ไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารที่ได้จากเห็ด *Oudemansiella* spp. เนื่องจากมีการปนเปื้อนแบคทีเรียทุกครั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว สารที่สกัดได้ไม่มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Alternaria*spp. สาเหตุโรคพืช จึงจำเป็นต้องมีการแยกเชื้อใหม่และทิ้งระยะเวลาไว้เพื่อกระตุ้นให้เส้นใยมีชีวิตก่อนเริ่มทำการทดลองอีกครั้ง

การทดลองที่ 3.5.7 การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคตายพรายของกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมการเกิดโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* โดยกรรมวิธีการใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5 , 10^6 และ 10^7สปอร์ต่อมิลลิลิตร และกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบ พบว่า ต้นกล้วยส่วนใหญ่มีอาการภายนอกที่เกิดกับใบและลำต้นเทียม หลังการปลูกเชื้อ 9 เดือน ในทุกกรรมวิธีการใช้เชื้อ *T. harzianum* แสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลืองจนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล ส่วนยอดยังคงหลายใบยังคงมีสีเขียว ไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่ในกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ต้นกล้วยแสดง อาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล กาบใบด้านนอกหักพับ ใบยอดทั้งหมดที่เหลือเริ่มเหี่ยว

การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนต่ำสุด คือ 1.95 และ 2.05 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 มีระดับอาการโรคภายใน 2.55 ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th2 และ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 2.85 และ 3.17 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนต่ำสุด คือ 1.53 และ 1.75 ตามลำดับ

ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 และ Th2 มีระดับอาการโรคภายใน 2.30 และ 2.50 ตามลำดับ ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 2.75

การใช้สปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *T. harzianum* ที่ความหนาแน่นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 มีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนต่ำสุด คือ 1.15 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th3 มีระดับอาการโรคภายใน 1.33 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 และ Th2 มีระดับอาการโรคภายใน 1.77 และ 1.85 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th4 ที่มีระดับอาการภายในต้น 2.25

กรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อมีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน 5.85 ซึ่งเป็นระดับการเกิดอาการภายในต้นกล้วยที่สูงกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ทั้งในหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การทดสอบวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ในการควบคุมการเกิดโรคตายพรายในกล้วยน้ำว้าที่มีสาเหตุจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม เปรียบเทียบกับกรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ พบว่า ต้นกล้วยส่วนใหญ่มีอาการภายนอกที่เกิดกับใบและลำต้นเทียม หลังการปลูกเชื้อ 9 เดือน ในทุกกรรมวิธีการใช้เชื้อ *T. harzianum* แสดงอาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล ส่วนยอดยังคงหลายใบยังคงมีสีเขียว ไม่แสดงอาการเหี่ยว แต่ในกรรมวิธีการใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อต้นกล้วยแสดง อาการเหี่ยวเป็นสีเหลือง จนในที่สุดแห้งเป็นสีน้ำตาล กาบใบด้านนอกหักพับ ใบยอดทั้งหมดที่เหลือเริ่มเหี่ยว

กรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 50 กรัม พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนต่ำสุด คือ 1.25 และ 1.32 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 มีระดับอาการโรคภายใน 1.55 ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th2 และ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 1.75 และ 1.87 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

กรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 100 กรัม พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนต่ำสุด คือ 1.25 และ 1.32 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2 และ Th4 ซึ่งมีระดับอาการโรคภายใน 1.35, 1.50 และ 1.45 ตามลำดับ ซึ่ง 3 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

กรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 150 กรัม พบว่า ในกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th5 และ Th3 มีระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือนต่ำสุด คือ 1.0 และ 1.0 ตามลำดับ ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีใช้เชื้อ Th1, Th2

และ Th4 โดย กรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1 มีระดับอาการโรคภายใน 1.17 ต่ำกว่าอย่างมีความแตกต่างทางสถิติกับ กรรมวิธีใช้เชื้อ Th2 และ Th4 ที่มีระดับอาการโรคภายใน 1.25 และ 1.35 ตามลำดับ ซึ่งทั้ง 2 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การตรวจสอบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 โดยกรรมวิธีการใส่เชื้อรา *T. harzianum* บนเมล็ดข้าวเปลือกในอัตรา 200 กรัมพบว่า ทุกกรรมวิธีของการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 มีระดับความรุนแรงของอาการโรคภายในต่ำเท่ากันคือ 1.0 ซึ่งระดับการเกิดโรคทั้ง 5 กรรมวิธีนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อเปรียบเทียบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ของกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 กับกรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อ พบว่า กรรมวิธีการใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่ไม่มีเชื้อมีระดับอาการภายใน 6.24 ซึ่งเป็นระดับการเกิดอาการภายในต้นกล้วยที่สูงกว่ากรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ทั้งในสัดส่วนเมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม

เมื่อเปรียบเทียบระดับอาการภายในหรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ที่เกิดขึ้นกับต้นกล้วยหลังจากปลูกเชื้อ 9 เดือน ในกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ความหนาแน่นของสปอร์ 10^5, 10^6 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร กับกรรมวิธีการใช้เชื้อ Th1, Th2, Th3, Th4 และ Th5 ในสัดส่วนเมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตรา 50, 100, 150 และ 200 กรัม พบว่า กรรมวิธีการใช้เชื้อที่เลี้ยงในข้าวเปลือก ทำให้ระดับการเกิดโรคภายในลำต้นของกล้วยต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน และเมื่อใส่เมล็ดข้าวเปลือกที่มีเชื้อรา *T. harzianum* ในอัตรา 200 กรัม เมื่อตรวจสอบแล้วไม่พบอาการของโรคภายในลำต้น หรือเนื้อเยื่อภายในเหง้าหรือรอบๆ ไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ดังนั้นกรรมวิธีการใช้เชื้อรา *T. harzianum* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวเปลือกมาเป็นวิธีการในการป้องกันกำจัดโรคเหี่ยวของกล้วยน้ำว้าที่เกิดจากเชื้อรา *F. oxysporum* f. sp. *cubense* ในสภาพแปลงปลูก จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดี มีแนวทางนำไปพัฒนาใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้

กิจกรรมที่ 4 การควบคุมสัตว์ศัตรูพืช และวัชพืชโดยชีววิธี
Biological Control of Animal Pests and Weed

ผู้วิจัย

ปราสาททอง พรหมเกิด[1] วิชาญ วรรธนะไกวัล[1] ดาราพร รินทะรักษ์[1]
ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์[1] สมเกียรติ กล้าแข็ง[1] ปิยาณี หนูกาฬ[1] อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข[1]
คมสัน นครศรี[1] ภัทร์พิชชา รุจิระพงศ์ชัย[1] เสริมศิริ คงแสงดาว[1] วิไลวรรณ เวชยันต์[1]
สาทิพย์ มาลี[1] ทรงทัพ แก้วตา[1] นงลักษณ์ ปั้นลาย[2]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี

คำสำคัญ(key word)

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี ศัตรูธรรมชาติ การผลิต เหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู *Sarcocystis singaporensis* หอยตัวห้ำ พืชแข่งขัน ไส้เดือนฝอย ทากพามาริออน หอยทากบก ถั่วคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม หญ้าคา ฝอยทอง ขี้ไก่ย่าน

บทคัดย่อ (Abstracts)

กิจกรรมการควบคุมสัตว์ศัตรูพืช และวัชพืชโดยชีววิธี มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการควบคุมสัตว์ศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี เพื่อใช้ลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร ช่วยสารตกค้างในผลผลิตและปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเกษตรกร ซึ่งจะนำไปสู่การควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน ดำเนินการระหว่างระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2557 โดยมีการทดลองทั้งสิ้น 7 การทดลอง เป็นการทดลองควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธีจำนวน 5 การทดลอง และการทดลองควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี 2 การทดลอง ดำเนินการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลพบุรี จังหวัดลพบุรี

การศึกษาการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอรีโรซีสต์เพื่อใช้ผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูศัตรูพืชพบว่า การเก็บในน้ำดื่มสะอาดหรือในสารละลายเกลือ PBS 1% นั้น เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในมากนัก โดยเก็บได้นาน 2 ปี โดยที่ภายในระยะเวลา 1 ปี สปอร์โรซีสต์มีชีวิตอยู่ได้และยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรค ทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ 100 % หากเก็บรักษามากกว่า 2 ปีขึ้นไป ไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้

การศึกษาการควบคุมหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี สำรวจพบหอยทากที่เป็นหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae จำนวน 5 genus 6 species คือ หอยนักล่าสีส้ม; *Gulella bicolor* (Hutton, 1843), หอยนักล่าสยาม; *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862), *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Haploptychius* sp., *Oophana* sp. และ *Discartemon* sp. และสำรวจพบไส้เดือยฝอย *Rhabditis* spp. ซึ่งจะต้องศึกษาประเมินศักยภาพในการนำไปใช้ควบคุมหอยศัตรูพืชต่อไป

การศึกษาควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี พบว่าฝอยทองมีศักยภาพในควบคุมขี้ไก่ย่านได้ดี การควบคุมอยู่ในลักษณะรักษาสมดุลย์ ไม่สามารถทำให้ต้นขี้ไก่ย่านหมดไปได้ ฝอยทองชนิดมีเมล็ดควบคุมต้นขี้ไก่ย่านได้เร็วกว่า ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ด ส่วนการใช้ถั่ว *C. caeruleum* ควบคุมหญ้าคาพบว่า การปลูกถั่ว *C.*

caeruleum จำนวน 2- 4 ต้นต่อตารางเมตร สามารถเจริญเติบโตครอบคลุมพื้นที่ได้เร็วทำให้หญ้าคาไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายในที่สุดในระยะเวลา 5 เดือนหลังปลูก

บทนำ (Introduction)

การควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธี

Sarcocystis singaporensis Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัยได้แก่หนูและงูเหลือม พบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งค้นพบโดยศาสตราจารย์ Zamen เป็นครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ การขยายพันธุ์ของปรสิตชนิดนี้ภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของ งูเหลือม (*Python reticulatus*) เป็นแบบมีเพศ ภายหลังจากที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแล้ว ผนังเซลล์ จะถูกสร้างขึ้นมาห่อหุ้มไซโกต (Zygote) และพัฒนาเป็นโอโอซีสต์ (Oocyst) ซึ่งในขั้นตอนนี้เป็นการสร้าง 2 สปอร์โรซีสต์ (Sporocysts) ใน 1 โอโอซีสต์ โดยใน 1 สปอร์โรซีสต์นั้นประกอบไปด้วย 4 สปอร์โรซอยด์ (Sporozoites) (Levine, 1986 และ Dubey และคณะ, 1989) ระยะสปอร์โรซอยด์ (Infective sporozoites) เป็นระยะที่พร้อมสำหรับการติดเชื้อ ซึ่งสปอร์โรซีสต์นั้นจะถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมพร้อมกับมูลของงูเหลือม ซึ่งสปอร์โรซีสต์นั้นสามารถทนทานอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในธรรมชาติได้เป็นเวลานาน จนกว่าจะเจอสภาวะที่เหมาะสมจึงพัฒนาเข้าสู่ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในสัตว์อาศัยตัวกลางต่อไป

เมื่อสัตว์อาศัยตัวกลางของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้แก่หนูหลายชนิดในสกุลหนูท้องขาว (*Rattus* spp.) และสกุลหนูพุก (*Bandicota* spp.) กินน้ำหรืออาหารที่ปนเปื้อน สปอร์โรซีสต์จากมูลงูเหลือมเข้าไป ก็ทำให้ได้รับปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เข้าไปในร่างกาย หลังจากที่ สปอร์โรซีสต์เข้าไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์อาศัยตัวกลางแล้ว สปอร์โรซีสต์จะถูกย่อยสลายและปล่อยสปอร์โรซอยด์ที่อยู่ภายในออกมาในลำไส้ของสัตว์อาศัยตัวกลาง ภายใน 15 นาที (Dubey และคณะ, 1989) เมื่อสปอร์โรซอยด์ถูกปล่อยออกมา จะเริ่มพัฒนาและเติบโตในเยื่อบุผิวลำไส้ และเกิดการพัฒนาครั้งที่ 1 ของระยะ Merogony บริเวณผนังหลอดเลือดแดงเข้าสู่ระยะ Schizonts และเริ่มพัฒนาเป็น Meronts และ Merozoites ตามลำดับ ในการพัฒนาครั้งที่ 2 ของระยะ Merogony เกิดขึ้นในบริเวณผนังหลอดเลือดฝอย และปล่อย Merozoites จาก Schizonts เข้าสู่กระแสเลือด (Dubey และคณะ, 1989) หลังจากนั้นเข้าสู่เนื้อเยื่อประสาท หัวใจและอวัยวะต่างๆ และพัฒนาเป็น Metrozytes ตามลำดับ หลังจากการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนหลายๆครั้งของ Metrozytes จะมีการสร้างซีสต์ (Sarcocysts) ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโต ภายในมี Bradizoites บรรจุอยู่ ในระยะนี้เป็นระยะที่พร้อมเข้าสู่ร่างกายของสัตว์อาศัยสุดท้าย (Gardiner และคณะ, 1985) ซึ่งก็คืองูเหลือมโดยฝังตัวตามอวัยวะต่างๆและกล้ามเนื้อทั่วร่างกายของหนูในสกุลหนูท้องขาวและสกุลหนูพุก เมื่อหนูที่ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้อาศัยอยู่ ถูกกินเป็นอาหารโดยสัตว์ผู้ล่าตามธรรมชาติ วงจรชีวิตของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ก็กลับมาเริ่มต้นเป็นวงจรชีวิตใหม่อีกครั้ง

การใช้ปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ซึ่งเป็นระยะที่ทำให้หนูติดเชื้อ เพื่อผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้มีความจำเพาะต่อหนูสกุลหนูท้องขาวและหนูพุกเท่านั้น (ยุวลักษณ์ และคณะ 2539a, ยุวลักษณ์ และคณะ 2539b, ยุวลักษณ์ และคณะ 2540 และ Jakel และคณะ, 1996) การผลิตขยายปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง และไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อป่วยตายได้ จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติมา

ให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และเหยื่อ โปรโตซัวกำจัดหนูที่มีศักยภาพสูงขาดความสม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง

นอกจากนี้ยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ โดยมากประมาณ 90% มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆ พบปะปนอยู่ด้วย (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2541) ทำให้ได้เชื้อปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองที่ไม่เท่ากัน อย่างไรก็ดีสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์บางหลอดที่ใสสะอาดและเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 - 7 เดือน และนำมาใช้ผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น ยังคงมีศักยภาพสูงในการทำให้หนูป่วยตายได้ถึง 100% (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2542) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Beaver และ Maleckar, 1981 ได้รายงานว่า ในมูลงูเหลือมมิได้มีเฉพาะสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* เพียงอย่างเดียว แต่ยังพบสปอร์โรซีสต์ *S. vilivillosi* และ *S. zamani* และสปอร์โรซีสต์เหล่านี้ที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ประมาณ 1-2 ปี ยังคงมีชีวิตและความรุนแรงในการทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้

ดังนั้นการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่มีศักยภาพสูงในน้ำเปล่าหรือในสารละลายเกลือ PBS 1% นั้นสามารถรักษาการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องการทราบเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคต่อหนูสูง สามารถทำให้โปรโตซัวมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานานและยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูได้ เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูต่อไป

จากรายงานทางวิชาการพบว่าสัตว์ในกลุ่มหอย และทากหลายชนิดจัดเป็นสัตว์ศัตรูพืชที่สำคัญและระบาดในประเทศไทย เช่น หอยทากยักษ์อาฟริกา,*Achatinafulica*Bowdich (1822)หอยดักดานหรือหอยทากสยาม,*Cryptozonasiamensis*(Pfeiffer) หอยเลขหนึ่ง,*Ovachlamysflugens* (Gude)หอยสาริกา,*Sarika* spp. และทากพามาริออน,*Pamarion* spp.เป็นต้น ซึ่งการควบคุมและกำจัดสัตว์ศัตรูพืชในปัจจุบันเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมี ซึ่งมีความสะดวก รวดเร็ว แต่อาจจะส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และอาจตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งส่งผลต่อสุขภาพของเกษตรกรโดยตรง ซึ่งแตกต่างจากการควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธีซึ่งส่งผลดีต่อสิ่งแวดล้อมและไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพเกษตรกรอีกด้วย

หอยและทากเป็นศัตรูที่สำคัญในสวนกล้วยไม้ โดยจะกัดกินราก ต้นอ่อน ใบ และดอกกล้วยไม้ ทำให้ได้รับความเสียหาย และชะงักการเจริญเติบโต บางครั้งตัวหอยจะติดไปกับดอกกล้วยไม้ ที่ตัดดอกส่งขายในกลุ่มประเทศสหภาพยุโรป สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น เป็นต้น ซึ่งถ้าตรวจพบจะถูกเผาทำลายทันที เป็นการสูญเสียเงินตรา และยังถูกเข้มงวดการส่งออกดอกกล้วยไม้ครั้งต่อไปอีกด้วย

ทากพามาริออน *Parmarion* sp. ลำตัวมีรูปร่างยืดยาว (Longitudinal) ลำตัวอ่อนนุ่มสีเทาดำ มีเมือกมาก เปลือกจะลดรูปเป็นแผ่นเล็กๆติดอยู่ด้านบนของลำตัวมีแผ่นหนัง (mantle)สีเข้มเกือบดำหุ้มปกคลุมเปลือกอยู่ตรงกลางลำตัว ขนาดลำตัวยาว 30 – 40 มิลลิเมตร ส่วนหัวปลายสุดมีปากอยู่ต่ำลงมาด้านล่าง มีหนวด 1 คู่ อยู่ด้านบนเหนือปากยืดหดได้และมีตาอยู่ปลายหนวดแต่ละข้าง เวลาเคลื่อนที่จะทิ้งเมือกไว้เป็นทาง มีสองในตัวเดียวกันแต่จับคู่ผสมข้ามตัว ออกไข่เป็นกลุ่มๆละ 30 – 50 ฟองตาม ซอกดิน หรือใต้วัสดุ ใบไม้ ที่ชุ่มชื้นเปลือกไข่ใสนิ่มเป็นพวกไคติน ทากออกหากินเวลากลางคืน โดยกัดกิน ลำตัน ใบ ดอกและช่อดอก ผลไม้ และพืชผัก จนเสียหายและการที่มีเมือกมาก จึงเป็นพาหนะนำโรคพืชทำให้พืชที่ถูกกัดเป็นแผลเน่าตาย (ปราสาททอง และ ชมพูนุท, 2550) เกษตรกรจึงทำการป้องกันกำจัดทากค่อนข้างยาก บางครั้งต้องใช้ไฟส่องหาจับเวลากลางคืนและการพ่นด้วยสารเคมีมักไม่ค่อยได้ผล เพราะการพ่นสารต้องให้ถูกตัว ดังนั้นจึงต้องหาวิธีการควบคุมทากอย่างมีประสิทธิภาพและปลอดภัย จึงทำการศึกษาการควบคุม ทากโดยชีววิธี ด้วยการใช้ไส้เดือนฝอยมาควบคุมทากพามาริออน ซึ่งในต่างประเทศมีการใช้ไส้เดือนฝอย *Phasmarhabditis hermaphrodita* (Shneider) กำจัดหอยทากในแปลงปลูกพืช (

Glen et. al, 1996) ปราสาททอง และ คณะ (2550) ได้ศึกษาประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย 5 ชนิดควบคุมหอยทากซัคซิเนียในห้องปฏิบัติการ พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถฆ่าหอยได้ การที่หอยทากมีลำตัวอ่อนนุ่มมีเมือกและอาศัยอยู่ตามที่ชื้นแฉะซึ่งเป็นสภาวะที่ไส้เดือนฝอยสามารถเจริญคงอยู่ได้ จึงน่าจะศึกษาวิจัยการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมทาก เพื่อนำมาใช้เป็นเทคโนโลยีการควบคุมทากในสวนกล้วยไม้ต่อไป

สถานการณ์ปัจจุบัน ยังพบการระบาดของหอยศัตรูพืชในสวนกล้วยไม้ และไม้ดอกไม้ประดับชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก อันนำมาสู่ปัญหาในการส่งออกกล้วยไม้ แม้จะมีการนำเอาวิธีการต่างๆมาใช้ควบคุม แต่ก็ไม่สามารถกำจัดหอยเหล่านี้ให้หมดไปโดยสิ้นเชิง การใช้สารเคมีเป็นจำนวนมากในการกำจัดและป้องกันศัตรูพืชเศรษฐกิจ ตลอดจนใช้ช่วยในการเก็บรักษาผลผลิตทางเกษตรกรรม ทำให้ผลเสียที่ตามมาคือการเกิดมลภาวะและพิษตกค้างจากสารเคมีเหล่านี้ การวิจัยและพัฒนาวิธีทางชีวภาพ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเทคโนโลยีการควบคุมจัดการหอยทากศัตรูพืชเพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์

การศึกษาเกี่ยวกับชนิดหอยทากในประเทศไทยนั้น ได้มีผู้ทำการศึกษา ดังนี้ Martens (1860) สำรวจและศึกษาชนิดของหอยทากบกในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ พบว่าในประเทศไทย มีหอยทากบกกลุ่มที่ไม่มีฝาปิด (pulmonate snail) จำนวน 17 ชนิด และจากการสำรวจของ Panha (1996) พบว่าหอยทากบกกลุ่มดังกล่าว สามารถจำแนกได้เป็น15 family 50 genus และมีจำนวนมากกว่า 136 ชนิด ชมพูนุท และคณะ (2550) สำรวจความหลากหลายของหอยทากและทากในแหล่งชีวมณฑลสะแกราช จังหวัดนครราชสีมา พบหอยทากตัวห้ำที่จัดอยู่ในวงศ์ Streptaxidae จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Oophana* sp. และ *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862), และพบทากกินเนื้อวงศ์ Rathouisiidae จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *Atopos* sp. นอกจากนี้ Dundee and Baerwald (1984) รายงานว่าหอยทากชนิดกินเนื้อ *Gulella bicolor* (Hutton, 1984) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Streptaxidae มีอวัยวะที่ใช้ในการกินเหยื่อเรียกว่า แรดูลา (radula) ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากที่พบในหอยทากชนิดที่กินพืชเป็นอาหาร หอยชนิดนี้เป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นของประเทศไทย มีความเป็นไปได้ว่ามีการแพร่เข้ามาโดยติดมากับการนำเข้าไม้ดอกไม้ประดับบางชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหอยทากชนิดกินเนื้อ (carnivorous snail) หลายชนิด มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ *Odontartemon* sp., *Gonaxis* sp. *Euglandina rosea* , *Steptaxis* sp. (Burch, 1962) และ (Fisher *et*. al., 1980) โดยในบางประเทศแถบอเมริกา มีการนำเอาหอยทากกินเนื้อเหล่านี้ใช้ควบคุมหอย *Bradybaena* sp. และหอยทากยักษ์ซึ่งเป็นศัตรูพืชในสวนไม้ดอกไม้ประดับอีกด้วย

อนึ่ง การใช้หอยตัวห้ำมาควบคุมหอยทากในประเทศไทย ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นหากมีการศึกษาชนิดและการใช้หอยตัวห้ำเพื่อใช้ควบคุมหอยศัตรูพืช ร่วมกับวิธีการต่างๆ คาดว่าจะสามารถควบคุมหอยทากศัตรูพืชได้ทั้งปี และยังช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีเกินความจำเป็น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเร่งทำการศึกษาเพื่อให้รู้ถึงข้อมูลพื้นฐานต่างๆของหอยทากตัวห้ำ เพื่อประโยชน์ในการเป็นแหล่งสืบค้นข้อมูลและเป็นทางเลือก ในการนำไปใช้วางแผนการจัดการหอยทากศัตรูพืช อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถถ่ายทอดแก่ผู้สนใจ ต่อไปได้

ในปี 2554 – 2556 ได้เริ่มสำรวจหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ที่มีในประเทศไทย นำมาจำแนกชนิดและศึกษาพฤติกรรมการกินหอยศัตรูพืชชนิดต่างๆ เพื่อคัดเลือกหอยตัวห้ำชนิดที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนามาใช้ควบคุมหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี ซึ่งได้สำรวจพบหอยทากที่เป็นหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae จำนวน 5 genus 6 species ได้แก่ หอยนักล่าสีส้ม, *Gulella bicolor* (Hutton, 1843), หอยนักล่าสยาม, *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862), *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Haploptychius* spp., *Oophana* spp. และ *Discartemon* spp. เมื่อศึกษา feeding behavior ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ทั้ง 5 genus ในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยตัวห้ำทุกชนิดมีศักยภาพในการกินหอยและไข่

หอยที่มีขนาดใกล้เคียงหรือขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย เช่น หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่งและหอยดักดาน โดยเฉลี่ยสัปดาห์ละ 2-3 ตัว และพบพฤติกรรมการไล่ตามเหยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเหยื่อที่มีขนาดเล็กหรืออ่อนแอกว่า จากการสังเกตพบว่ามีหอย 2 ชนิดที่น่าจะมีศักยภาพสูงในการควบคุมหอยศัตรูพืช ได้แก่ หอยนักล่าสยาม, *P. siamensis* และ *Oophana* spp**.** โดยพบว่าหอยนักล่าสยาม; *P. siamensis* (Pfeiffer,1862) มีศักยภาพมากที่สุด สามารถกินหอยดักดานขนาดเล็กได้ 1-1.5 ตัว/ วัน ใช้เวลาในการกินเหยื่อเฉลี่ย 3 - 5 นาที/ ตัว

จากผลการศึกษาข้างต้นในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยตัวห้ำในวงศ์ Streptaxidae หลายชนิด มีศักยภาพในการกินหอยศัตรูพืช หอยตัวห้ำดังกล่าวจึงเป็นสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาใช้เพื่อควบคุมหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี แต่ขั้นตอนศึกษาวิจัยและการพัฒนานำไปใช้ประโยชน์ยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นการคัดเลือกชนิดเพิ่มเติมรวมไปถึงการศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำชนิดที่มีศักยภาพสูง จึงมีความจำเป็นในแง่ของการเป็นข้อมูลพื้นฐานอันนำไปสู่การพัฒนาผลิต ขยายให้ได้ปริมาณมากและมีคุณภาพเพื่อนำไปใช้ในการจัดการหอยทากศัตรูพืชร่วมกับวิธีการต่างๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในทางเกษตรกรรม

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาปรสิตในหอยทากบกเริ่มขึ้นมากกว่า 150 ปี โดยในปี ค.ศ.1859 ได้สำรวจพบหนอนตัวกลม (nematodes) *Pelodytes hermaphrodites*ในหอยทากบกและจากรายงานในปี ค.ศ.1990 พบระยะตัวอ่อนของ *Rhabditiscaussaneli*ในลำไส้ของทาก *Arion ater*ซึ่งต่อมาพบว่าหนอนตัวกลมจากรายงานทั้ง 2 เรื่องดังกล่าวเป็นหนอนตัวกลมชนิด *Plasmarhabditishermaphrodita*ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Rhabditidaeโดยพบระยะตัวอ่อน (larva) อาศัยอยู่ภายในลำไส้จนกระทั่งทากตาย (Robbie *et al*., 2007) ซึ่งตัวอ่อนระยะติดต่อของ*P.hermaphrodita* ดำรงชีพเป็นอิสระในดินและจะไชเข้าตัวของหอยทากบกที่เป็นสัตว์อาศัย (host) และเจริญเติบโตอยู่ภายในตัวหอยทากและปล่อยแบคทีเรียออกมาจากช่องทางเดินอาหาร ทำให้เนื้อเยื่อหอยถูกแบคทีเรียทำลายและเกิดการอักเสบ บวม และติดเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุทำให้หอยทากไม่กินอาหารและตายในที่สุด (Glen *et al.,* 2000)จากนั้น*P.hermaphrodita* จะอาศัยและกินซากหอยทากเป็นอาหาร และสืบพันธุ์เพื่อผลิตตัวอ่อน ปล่อยลงพื้นดินเพื่อให้เจริญเติบโต รอไชเข้าหอยทากบกที่เป็นสัตว์อาศัยต่อไป (Pechova and Foltan, 2008)จากการศึกษาดังกล่าวสามารถนำมาทดลองเพื่อควบคุมหอยทากศัตรูพืชโดยชีววิธีในสหราชอาณาจักรโดยใช้ *P.hermaphrodita*ที่ได้จากเนื้อเยื่อภายในของหอยทาก *Derocerasreticulatum*นำมาทดลองในแปลงจนประสบผลสำเร็จและวางจำหน่ายโดยใช้เครื่องหมายการค้า Nemaslug® (Wilson *et al*., 1993a; Wilson *et al*., 1993b) ซึ่งสามารถควบคุมหอยทากบกหลายชนิด เช่นวงศ์ Lymacidae, วงศ์ Arionidae, วงศ์ Milacidaeและวงศ์ Vagnulidae (Wilson *et al*., 1993a.; Grim, 2002) นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลต่อหอยน้ำในวงศ์ Lymnaeidaeด้วย (Morley and Morit, 2006; Wilson *et al*., 2000.) แต่ไม่มีผลต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ รวมทั้งไส้เดือนดินและแมลงด้วย (Grewal and Grewal, 2003)

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบหนอนพยาธิ *Leucochloridiumparadoxum* ซึ่งเป็นปรสิตที่อยู่ในกลุ่มหนอนตัวแบน (Platyhelminthes) โดยมีสัตว์อาศัยได้แก่ หอยสกุล*Succinea*ซึ่งเป็น intermediate host และมีนกมากกว่า 15 ชนิดเป็น final host พบในทวีปยุโรปและอเมริกาเหนือ (Dawes,1946 และ Rennie, 1992) หอยซัคซิเนียได้รับพยาธิชนิดนี้จากการกินมูลของนกที่มีไข่พยาธิอยู่ และไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนระยะไมราซิเดียม (miracidium) เจริญอยู่ในทางเดินอาหารของหอยทากต่อมาระยะดังกล่าวจะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะสปอร์โรซีสต์ (sporocyst) และเจริญเติบโตอยู่ภายในท่อที่เรียกว่า broodsacซึ่งพัฒนาต่อไปเป็นระยะเซอร์คาเรีย (cercaria) ประมาณ 10 – 100 ตัว อัดแน่นอยู่ภายในท่อ และมีการเจริญเข้าไปทั่วหนวดของหอยทาก (Schmidtand Roberts, 2000) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณดังกล่าวอย่างเห็นได้ชัด ได้แก่ หนวดบวมและมีการเคลื่อนที่เป็นจังหวะ มี

สีสันฉูดฉาด และทำให้ตาของหอยทากสูญเสียความสามารถในการรับรู้ความเข้มแสง และทำให้พฤติกรรมหอยทากเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือโดยทั่วไปหอยทากจะหลีกเลี่ยงบริเวณที่มีแสงสว่างและหลบอาศัยอยู่ในที่มืดเพื่อป้องกันตัวเองจากนักล่า แต่ในหอยทากที่ถูกควบคุมโดยตัวอ่อนระยะเซอร์คาเรียมักจะออกมาเดินในที่โล่งแจ้งตอนกลางวัน ทำให้กลายเป็นอาหารของนกได้โดยง่าย (Edwin and Robinson, 1947) จากการศึกษาพบว่าปรสิตชนิดนี้ไม่สามารถติดต่อถึงมนุษย์ได้ แต่หากจะนำมาใช้ควบคุมประชากรหอยต้องมีการศึกษาด้านชีววิทยารวมถึงผลกระทบต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ ด้วย (DeLaCruz,2003)

การควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี

ขี้ไก่ย่าน (Mile-a-minute or Chinese creeper); *Mikania micrantha* H.B.K. อยู่ในวงศ์ Asteraceae เป็นวัชพืชใบกว้างอายุหลายปี ที่เจริญเติบโตเร็ว ลำต้นเป็นเถาเลื้อยปกคลุมพันธุ์ไม้อื่น ทำให้ขาดน้ำอากาศและแสงแดดจนตาย พบขึ้นทั่วไปขยายพันธุ์เร็วในสภาพดินชื้น และใกล้แหล่งน้ำ แพร่กระจายในแหล่งปลูกพืชยืนต้น โดยเฉพาะพื้นที่รอบโรงเรือนเพาะชำ และโรงเรือนกล้วยไม้ จากการที่ขี้ไก่ย่านมักเลื้อยพันขึ้นที่สูงปกคลุมต้นไม้ เมื่อเมล็ดแก่จึงปลิวตามลมแพร่กระจายไปได้ไกล ควบคุมกำจัดได้ยาก เดิมพบทางภาคใต้ และที่จังหวัดเชียงใหม่ในสวนลำไย ปัจจุบันพบต้นขี้ไก่ย่านระบาดบริเวณจังหวัดชานเมืองรอบกรุงเทพ และบริเวณสวนผลไม้ เช่นมะม่วง กล้วยไม้ กล้วย มะพร้าว อำเภอพุทธมณฑล อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม อำเภอบางกรวย จังหวัดนนทบุรี และจังหวัดสมุทรสาคร จันทบุรี ระยอง เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดเพชรบูรณ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขี้ไก่ย่าน ใบเป็นใบเดี่ยวออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน แผ่นใบรูปไข่แกมสามเหลี่ยมคล้ายลูกศร ฐานใบเว้าเป็นรูปหัวใจ ขอบใบจัก ปลายใบแหลม ดอกออกเป็นช่อ สีขาว และดอกย่อยทุกดอกอยู่ในระดับเดียวกัน กลีบดอกย่อยสีขาว ผลมีเปลือกบางและเหนียว เมล็ดมีขนสีขาวที่ปลายด้านหนึ่ง และผลิตเมล็ดได้จำนวนมาก 170,000 เมล็ดต่อพื้นที่ปกคลุม 1 ตารางเมตร ช่อดอกคล้ายช่อดอกสาบเสือ แพร่กระจายโดยปลิวไปกับลมและน้ำ ขยายพันธุ์ได้ทั้งจากเมล็ดและส่วนของลำต้นที่แตะดินสามารถงอกรากเจริญเติบโตต่อไปได้

การควบคุมขี้ไก่ย่านที่ดีที่สุดคือการป้องกันตั้งแต่แรกไม่ให้เข้ามาในพื้นที่ แต่หากเข้ามาในพื้นที่แล้ว ก็ควรกำจัดตั้งแต่ต้นยังเล็ก โดยการถาก ถอน เมื่อยังเป็นต้นอ่อน ในระยะกำลังเจริญเติบโต ก่อนออกดอกผลิตเมล็ด หากปล่อยไว้จนโตเมื่อกำจัดต้นออกแล้ว ต้องดึงส่วนลำต้นที่ติดอยู่กับดินและเหง้าออกให้หมด และต้องทำลายชิ้นส่วนพืชที่ยังมีชีวิตทั้งหมด หรือพ่นกำจัดด้วยสารกำจัดวัชพืช ในพื้นที่ขนาดใหญ่การเผาจะได้ผลดีที่สุด และตามกำจัดต้นงอกใหม่ต่อเนื่อง จนกว่าจะหมดไปจากพื้นที่ หรือใช้วัสดุคลุมพื้นที่ที่ยังมีตอหลงเหลืออยู่ เพื่อลดการงอกใหม่จากเมล็ดและการแตกใหม่จากตอ ขี้ไก่ย่านเป็นพืชที่ไม่ชอบร่มเงา สวนลิ้นจี่ในประเทศจีน มีรายงานการใช้ฝอยทอง (Field Dodder); *Cuscuta campestris* Yunker กำจัดขี้ไก่ย่าน ซึ่งเมื่อฝอยทองเบียนดูดกินน้ำเลี้ยงจนต้นขี้ไก่ย่านที่ปกคลุมต้นลิ้นจี่ตายแล้ว ฝอยทองก็ตายไปด้วย โดยฝอยทองไม่ทำลายต้นลิ้นจี่ (Zhang *et al*, 2004)

ฝอยทอง จัดอยู่ในวงศ์ Convolvulaceae เป็นวัชพืชประเภทกาฝาก ที่ขึ้นพันเกาะดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นไม้ สามารถทำลายวัชพืชบางชนิดได้ ต้นฝอยทองแตกกิ่งก้านสาขามาก ใบลดรูปเป็นใบเกล็ด รูปสามเหลี่ยมเล็กๆ ออกดอกเป็นช่อสีขาว ดอกย่อยไม่มีก้าน ไม่สามารถอยู่เดี่ยวๆได้ ดำรงชีวิตอยู่ได้โดยดูดกินอาหารและน้ำจากพืชอาศัย วงจรชีวิตของฝอยทองเริ่มจากงอกจากเมล็ดที่อยู่ในดิน ไม่มีราก ไม่มีใบ ชูยอดอ่อนสีเหลืองขึ้นหมุนหาที่ยึดเกาะ การที่จะมีชีวิตอยู่ได้นานแค่ไหนขึ้นอยู่กับอาหารสะสมในเมล็ด เมื่อสัมผัสกับพืชอาศัยที่เหมาะสม จะสร้างเนื้อเยื่อเล็กๆ (ลักษณะคล้ายปุ่มปมบนหนวดปลาหมึก) เรียกว่า haustoria ยึดติดกับต้นพืชอาศัยแทรกเข้าไปดูดกินอาหารและน้ำจากท่อน้ำและท่ออาหารของพืชอาศัย

การยึดเกาะดูดกินน้ำและอาหารจากต้นพืชอาศัย (การเบียน) เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตลอดอายุการเจริญเติบโตของฝอยทอง จนทำให้ส่วนของต้นพืชอาศัยที่ถูกฝอยทองเบียนแห้งตาย ฝอยทองเป็นวัชพืชในพืชผักหลายชนิดเช่น หน่อไม้ฝรั่ง มะเขือ กระเทียม แตง หอมหัวใหญ่ พริก มันฝรั่ง มันเทศ มะเขือเทศ (Lanini et al., 2002)

ฝอยทองที่พบเห็นปกคลุมต้นไม้ใหญ่ตามข้างถนน เป็นฝอยทองขนาดใหญ่ลำต้นมีขนาดเท่าเส้นขนมจีนสีเหลืองสด ชื่อ Giant dodder ; *Cuscuta reflexa* ส่วนฝอยทองที่ใช้ในการทดลองนี้ ฝอยทองชนิดที่พบในประเทศไทย มีลำต้นเป็นเส้นกลมยาวอ่อนนุ่มสีเหลือง ขนาดเท่าฝอยทองที่เป็นขนมหวาน พบที่จังหวัดเชียงใหม่ขึ้นอยู่กับต้นขี้ไก่ย่านในแหล่งที่มีต้นไมยราบยักษ์ระบาด ชนิดมีเมล็ด คือ Chinese dodder ; *Cuscuta chinensis* Lamk. และฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ด (จึงไม่สามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้) พบที่บริเวณจังหวัดนครปฐม ขึ้นอยู่กับต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นแหล่งที่มีต้นธูปฤาษี

หญ้าคา ชื่อวิทยาศาสตร์ *Imperta cylindrical* Beauv ชื่อสามัญ Cogongrass เป็นวัชพืชอายุหลายปีแพร่ระบาดด้วยไหลใต้ดินและเมล็ด ผลิตเมล็ดได้มากถึง 3,000 เมล็ดต่อต้น ขยายพันธุ์รวดเร็วด้วยไหลใต้ดิน(Holm *et al*.1977) ทำความเสียหายด้วยแก่งแย่งธาตุอาหารและน้ำกับพืชปลูก ปลดปล่อยสารธรรมชาติบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชอื่น หญ้าคาพบได้ทั้งในพืชไร่ พืชสวนและพื้นที่รกร้างว่างเปล่า เจริญเติบโตได้ดีทั้งในที่ดินแห้งและดินชื้น การกำจัดหญ้าคาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเผา การใช้จอบสับลำต้นใต้ดินให้เป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อยและการใช้สารกำจัดวัชพืชซึ่งสะดวกและรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการใช้สารกำจัดวัชพืชปริมาณที่มากอาจมีผลกระทบทั้งพืชปลูก เกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมได้ การป้องกันกำจัดอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้สารกำจัดวัชพืชในหญ้าคาได้คือ การใช้พืชคลุมดินเพื่อป้องกันการงอกและการเจริญเติบโตของวัชพืช โดยวิธีการใช้พืชตระกูลถั่วปลูกคลุมดิน นอกจากนั้นพืชตระกูลถั่วเมื่อตายและเน่าสลายตัวก็จะเป็นปุ๋ยช่วยบำรุงดิน และยังช่วยป้องกันการชะล้างของหน้าดินที่ปลูกพืชในสภาพลาดชันได้ด้วย พืชตระกูลถั่วที่นิยมปลูกในสวนปาล์มน้ำมันและยางพารา ได้แก่ *Calopogonium caeruleum*, *Calopogonium mucinoides*, *Pueraria phaseoloides*, *Centrosema pubescens* และ *Mucuna cochinchinensis* (นิรนาม,2547) สำหรับถั่ว *C. caeruleum* เป็นประเภทเถาเลื้อย ทนร่มเงาได้ดี มีปัญหาโรคแมลงรบกวนน้อย ส่วนพืชตระกูลถั่วที่เหลือทนร่มเงาได้น้อยกว่าเมื่อปาล์มน้ำมันหรือยางพาราโตขึ้นมีร่มเงาถั่วพวกนี้จะค่อยๆลดลงและตายไปยกเว้นถั่ว *C. caeruleum* ดังนั้นจึงควรนำถั่วชนิดนี้มาทดสอบหาประสิทธิภาพในการควบคุมหญ้าคา เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดทำคู่มือคำแนะนำสำหรับเกษตรกรหรือผู้สนใจต่อไป

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methology)

กิจกรรมที่ย่อย 4.1 การควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธี

การทดลองที่ 4.1.1 การผลิตและการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์

1. มูลงูเหลือม
2. ชุดสีย้อม Nucleic acid (QIAGEN, Live/Dead backlight viability kit)
3. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
4. เครื่องปั่น (Centrifuge) Hettich รุ่น universal 16A
5. น้ำเกลือ PBS 1% (Phosphate Buffer Saline)
6. Blood counting chamber
7. หลอดปั่นขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร และ Cryotubes
8. สารเคมีได้แก่ NaCl (Sodium chloride), KCl (Potassium chloride), $NaHPO_4$ (Sodium Hydrogen Phosphate), KH_2PO_4 (Potassium dihydrogen Phosphate), Tween80, NaOCl (Sodium Hypochlorite), Trypsin, อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI medium, FBS (Fetal Bovine Serum), DMSO (Dimethyl sulfoxide) และน้ำดื่มบริสุทธิ์
9. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายสูง (Light microscope)
10. ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
11. Auto pipette และ Tips
12. หนูท้องขาวทดลอง (*Rattus rattus*)
13. กรงทดสอบหนู
14. ถังไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen tank)
15. ที่ให้อาหารโดยตรงจากปากสู่กระเพาะ (Feeding tube)

- วิธีการ การศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองย่อยที่ 1 เปรียบเทียบการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS

วางแผนการทดลองแบบ 2x5 factorial in CRD มี 5 ซ้ำ (5 เชื้อ) ซ้ำละ 3 หลอด แต่ละหลอดมีสปอร์โรซีสต์แขวนลอยอยู่ $1x10^6$ ซีสต์ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ สารละลายในการเก็บรักษามี 2 ระดับ คือ

1. น้ำดื่มสะอาด
2. สารละลายเกลือ PBS

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์มี 6 ระดับ คือ

1. 6 เดือน
2. 1 ปี
3. 2 ปี
4. 2 ปี 6 เดือน
5. 3 ปี
6. 3 ปี 6 เดือน

ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของโปรโตซัวทั้งสองปัจจัยโดยการใช้สีย้อม Nucleic acid และศักยภาพ ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อโปรโตซัวโดยวิธี Bioassay กับหนูท้องขาวที่ 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว
2. เปอร์เซ็นต์การตายของหนู

<u>การทดลองย่อยที่ 2</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวโดยวิธี Sugar flotation

วางแผนการทดลอง แบบ CRD มี 3 ซ้ำ (3 เชื้อ) ซ้ำละ 3 หลอด หลอดละ 1 ul 6 กรรมวิธี คือ

1. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 6 เดือน
2. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 1 ปี
3. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 2 ปี
4. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 2 ปี 6 เดือน
5. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 3 ปี
6. ตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10°C นาน 3 ปี 6 เดือน

การเตรียมสารละลาย

สารละลาย A: Sheather's solution: PBS +1% tween 80 (1:4)

สารละลาย B: Sheather's solution: PBS +1% tween 80 (1:2)

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการปั่นล้างมูลงูเหลือมจนได้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และนับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้ ใส่สารละลาย B 15 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่สารละลาย A 10 มิลลิลิตร และใส่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ไว้ด้านบนสุดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายรินส่วนชั้นของสปอร์โรซีสต์ที่อยู่เหนือตะกอน ลงในหลอดปั่นหลอดใหม่ขนาดเดียวกัน 2 หลอด ในปริมาตรที่เท่ากัน ปั่นตกตะกอนอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดสารละลายที่อยู่เหนือตะกอนออกช้าๆ ให้แต่ละหลอดเหลือสารละลายประมาณ 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยทั้งสองผสมลงใน หลอดเดียวกันและนับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่เก็บเกี่ยวได้ ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม Nucleic acid ทุก 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว

<u>การทดลองย่อยที่ 3</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในไนโตรเจนเหลว

ทำการทดลองโดยสลายผนังเซลล์ของสปอร์โรซีสต์จำนวน 200,000 ซีสต์ เพื่อแยกแต่ละเซลล์โปรโตซัว (Sporozoits) ออกมา แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน จากนั้นนำเซลล์โปรโตซัวออกมาทดสอบการสร้างซีสต์ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูท้องขาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ (4 เชื้อ) ซ้ำละ 1 ตัว 6 กรรมวิธี (ระยะเวลาการเก็บรักษา) คือ

1. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 6 เดือน
2. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 ปี
3. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 2 ปี
4. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 2 ปี 6 เดือน
5. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 3 ปี

6. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 3 ปี 6 เดือน

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ลงในหลอดปั่น 15 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย NaOCL 8% 5 มิลลิลิตร (น้ำกลั่น 4.6 มิลลิลิตร และ NaOCL 0.4 มิลลิลิตร) และเขย่าสารละลายทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง ล้างด้วยน้ำกลั่น ละลายตะกอนเซลล์ใน RPMI medium แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Pepsin ลงไปในตะกอนเซลล์ แล้วเขย่าทันที แล้วทำการย่อยที่ 37°c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที และเติมสารละลาย trypsin ลงไปในตะกอนเซลล์ แล้วเขย่าทันที ทำการย่อยที่ 37°c เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการเช็คลักษณะสปอร์โรซอยด์โดยกล้องจุลทรรศน์และนำไปปั่นเหวี่ยงอีก 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วย RPMI medium และนำไป ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วย FBS ตามลำดับ แล้วทำการนับจำนวนสปอร์โรซอยด์ใน Hemocytometer โดยกล้องจุลทรรศน์ แล้วนำสปอร์โรซอยด์แช่น้ำแข็ง สำหรับการเก็บ Freezing ผสม RPMI 840 มิลลิลิตร , DMSO (10%) 120 ไมโครลิตร และ FBS (20%) 240 ไมโครลิตร แล้วทำการเก็บเซลล์ที่ได้ลงใน Cryotubes หลังจากนั้นเก็บลงใน Liquid nitrogen

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซ็นต์การตายของหนู

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้นตุลาคม 2553 สิ้นสุดกันยายน 2557

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

การทดลองที่ 4.1.2 ศึกษาประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย*Steinernema* sp. ควบคุมทากพามาริออน *Parmarion* sp.

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1.สัตว์ทดลอง

ทากพามาริออน *Parmarion* sp.

ไส้เดือนฝอย *Steinemema carpocapsae S. riobrave S. glaseri*

2. เครื่องมือ

2.1 กล่องพลาสติก ขนาด 6 x 10 x 3 เซนติเมตร

2.2 บีคเกอร์ ปิเปต ทีชชู อาหารปลา

2.3 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการทดลอง

แผนการทดลอง แบบ CRD 7 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1. ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อัตรา100,000 ตัวต่อ กล่อง
2. ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อัตรา 200,000 ตัวต่อ กล่อง
3. ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 100,000 ตัวต่อ กล่อง
4. ไส้เดือนฝอย *S. riobravae* อัตรา 200,000 ตัวต่อ กล่อง

5. ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* อัตรา 100,000 ตัวต่อ กล่อง
6. ไส้เดือนฝอย *S. glaseri* อัตรา 200,000 ตัวต่อ กล่อง
7. กรรมวิธีควบคุมให้อาหารปลาปกติ

การทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ

1.เก็บรวบรวมหอยทากพานาริออน จากแปลงสวนเกษตรกรมาเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร

2. คัดแยกทากที่สมบูรณ์ออกใส่กล่อง ขนาด 6x 10x 3 เซนติเมตร กล่องละ 5 ตัว แล้วให้อาหารปลาชนิดเม็ดเก็บไว้ 1 คืน

3. เตรียมไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด จากกลุ่มงานปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา เพื่อนำมาทดสอบกับทากพามาริออน ตามแผนการทดลองที่กำหนด

2. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1. เก็บรวบรวมหอยทากพามาริออน จากแปลงสวนเกษตรกรมาเลี้ยงที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยกีฏและสัตววิทยา

2. คัดแยกทากที่สมบูรณ์ออกใส่กล่อง ขนาด 6 x 10x 3 เซนติเมตร กล่องละ 10 ตัว แล้วให้อาหารปลาชนิดเม็ดเก็บไว้ 1 คืน

3. เตรียมไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดโดยกลุ่มงานปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา เพื่อนำมาทดสอบกับทากพามาริออน ตามแผนการทดลอง จากนั้นนำทากมีชีวิตอยู่มาคงสภาพเพื่อเก็บเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ มาคงสภาพด้วยฟอร์มาลิน 10 % นาน 1 วันแล้วล้างออกด้วยน้ำประปา แล้วเก็บรักษาในแอลกอฮอลล์ 70 % นำชิ้นเนื้อเยื่อของทาก *Parmarion* sp มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 5 มิลลิเมตร ของอวัยวะระบบทางเดินอาหาร อวัยวะระบบสืบพันธุ์ (ovotestis) ระบบทางเดินหายใจ มาทำบล็อกพาราฟีน แล้วตัดแต่งหน้าบล็อก ตัดด้วยเครื่อง ไมโครโตม หนา 5 ไมโครเมตร ติดแผ่นเนื้อเยื่อบนสไลด์แก้ว อุ่นจนแห้ง เก็บใส่กล่องสไลด์ เพื่อรอย้อมสี ทำสไลด์ถาวร แล้วตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. เก็บข้อมูล

4.1. อัตราการตายของทากหามาริออน ในห้องปฏิบัติการ

4.2. ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูการทำลายของไส้เดือนฝอยต่อทาก

เวลา และ สถานที่ทำการทดลอง

เริ่ม ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2558

แต่เนื่องจากไส้เดือนฝอยที่นำมาทดสอบไม่มีประสิทธิภาพกำจัดทากพามาริออนได้ จึงขอยุติการทดลองใน ปี 2555 รวมเวลา 2 ปี

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กรมวิชาการเกษตร และแปลงสวนของเกษตรกร จังหวัด นครปฐม จังหวัด สมุทรสาคร และ จังหวัด กาญจนบุรี

การทดลองที่4.1.3 คัดเลือกชนิดและศึกษาพฤติกรรมการกินหอยทาก ของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ในประเทศไทย

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

- อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างหอย ได้แก่ กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ สเปรย์ฉีดน้ำ ถุงมือแพทย์ คีม คีบ พู่กัน ไฟฉาย กระดาษทิชชูอเนกประสงค์
- อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงหอย ได้แก่ ตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร และวัสดุรอง
- อุปกรณ์สำหรับศึกษาชีววิทยา ได้แก่ กล่องพลาสติกขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร และ ขนาด 6.5x9.5x2 เซนติเมตร พร้อมกระบอกฉีดน้ำ
- อาหารสำหรับหอยทดลอง เช่น อาหารปลา ผักสดชนิดต่างๆ เช่น ผักกาดขาว แตงกวาฯลฯ
- เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น เวอร์เนียร์ thermo-hygrometer, forceps และเครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์
- อุปกรณ์ประกอบการถ่ายภาพ ได้แก่ กล้องถ่ายภาพดิจิตอล และกล้องจุลทรรศน์
- เอกสารประกอบการศึกษาชีววิทยาและการจำแนกชนิดหอยทาก

วิธีการ

แผนการทดลอง แบบ RCB

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. <u>สำรวจ /เก็บตัวอย่าง /บันทึกเขตการแพร่กระจาย และทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae</u> โดยสำรวจทุกๆ 2 เดือน ตามพื้นที่ๆกำหนด เช่น พื้นที่ป่าธรรมชาติ โรงเรือนหรือพื้นที่เกษตรกรรมตามภาคต่างๆ และเก็บตัวอย่างมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร โดยเลี้ยงในตู้กระจก ขนาด 25 x 40 x 26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจกด้วยดินผสมขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) ให้สูงจากพื้นตู้กระจก 5 เซนติเมตร และให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้ง

2. <u>ตรวจสอบชนิดของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae</u>

นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ชื่อตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากบกทั้งในและต่างประเทศ โดยยึดตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001), Naggs (1989), Panha (1996) และ Vaught (1989) และศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือก โดยการสังเกต เปรียบเทียบ ถ่ายภาพและวาดภาพในห้องปฏิบัติการ

3. <u>ศึกษาชีววิทยาบางประการและพฤติกรรมการกินหอยทากของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae</u>

โดยเลือกหอยทากตัวห้ำ แต่ละชนิด มาแยกเลี้ยงในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x 22 x 7 เซนติเมตร จำนวน 5 ตัว/ กล่อง โดยให้อาหารเป็นหอยดักดานศัตรูพืช ฉีดพ่นน้ำเพื่อให้ความชื้น สังเกตและบันทึกผลการทดลอง พร้อมถ่ายภาพ ภายใต้กล้อง stereo microscope ในห้องปฏิบัติการ

4. <u>คัดเลือกชนิด และศึกษาศักยภาพการกินหอยทากของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae</u>

4.1 ทำการทดลองในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร โดยมีจำนวนหอยตัวห้ำชนิดละ 3 ซ้ำ ให้อาหารเป็นหอยทากศัตรูพืช วางแผนการทดลองแบบ RCB (ชนิดของหอยตัวห้ำเป็นกรรมวิธี) สังเกต และบันทึกจำนวนและชนิดหอยทากที่หอยตัวห้ำแต่ละชนิดกิน

4.2 ศึกษาผลกระทบของหอยตัวห้ำ ต่อสิ่งแวดล้อม โดยสังเกตพฤติกรรมการกินสัตว์ชนิดอื่น ทำการทดลองในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร ใส่หอยตัวห้ำแต่ละชนิด และให้อาหารเป็น

สัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น หนอนกระทู้ วางแผนการทดลองแบบ RCB (ชนิดของหอยตัวห้ำเป็นกรรมวิธี) สังเกตและบันทึกจำนวนและชนิดสัตว์ ที่หอยตัวห้ำแต่ละชนิดกิน

การบันทึกข้อมูล (ทุกขั้นตอนการทดลอง)

1. บันทึกวัน และสถานที่ เก็บตัวอย่างหอยทากตัวห้ำ
2. บันทึกข้อมูลทางภูมิศาสตร์และข้อมูลกายภาพ ของสถานที่เก็บตัวอย่าง
3. บันทึก/ ถ่ายภาพ และข้อมูลอื่นๆ ที่สังเกตได้อย่างละเอียด

เวลา สถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2556 รวม 3 ปี

สถานที่ : พื้นที่เกษตรกรรมและป่าธรรมชาติ ตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

การทดลองที่ 4.1.4 ศึกษาการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae เพื่อกำจัดหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

- อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างหอย ได้แก่ กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ สเปรย์ฉีดน้ำ ถุงมือแพทย์ คีมคีบ พู่กัน ไฟฉาย กระดาษทิชชูอเนกประสงค์
- อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงหอย ได้แก่ ตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร อ่างซีเมนต์/ตู้กระจก/ ดิน และวัสดุสำหรับให้หอยวางไข่ ได้แก่ กาบมะพร้าว ขุยมะพร้าว และอิฐแผ่น
- อาหารสำหรับหอยทดลอง เช่น อาหารปลา ผักสดชนิดต่างๆ เช่น ผักกาดขาว แตงกวาฯลฯ
- เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น เวอร์เนียร์ thermo-hygrometer, forceps และเครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ และความชื้นในดิน
- อุปกรณ์ประกอบการถ่ายภาพ ได้แก่ กล้องถ่ายภาพดิจิตอล และกล้องจุลทรรศน์
- เอกสารประกอบการศึกษาชีววิทยาและการจำแนกชนิดหอยทาก
- หอยตัวห้ำ สำหรับเป็นแม่พันธุ์
- หอยศัตรูพืช (ใช้หอยดักดาน) สำหรับเลี้ยงหอยตัวห้ำ และอาหารเสริมชนิดต่างๆ เช่น รำละเอียด และผงแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เป็นต้น
- เครื่องวัดพิกัดภูมิศาสตร์ (GPS) สำหรับระบุพิกัด ที่เก็บตัวอย่างหอยทากตัวห้ำ

วิธีการ

ขั้นตอนที่1 การเพาะ/เลี้ยงหอยศัตรูพืช (ใช้หอยดักดาน; *Cryptozona siamemsis*) สำหรับเป็นอาหารหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

1.1 เก็บรวบรวมหอยดักดาน จากพื้นที่เกษตรกรรมต่างๆ มาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ

1.2 ดำเนินการเพาะเลี้ยงหอยดักดาน ในตู้กระจกขนาด 25 x 40 x 26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจก ด้วยดินผสมขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 ให้สูงจากพื้นตู้กระจกประมาณ 5 เซนติเมตร ให้อาหารเป็นอาหารปลาชนิดเม็ด และผักกาดขาว ให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำ วันละ 1 ครั้ง ในช่วงเช้า

1.3 คัดเลือกหอยดักดาน ที่มีอายุประมาณ 7 วัน ขนาดความกว้างของเปลือก 0.5 เซนติเมตร สำหรับใช้เป็นอาหารหอยตัวห้ำ ในขั้นตอนทดลองต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การศึกษาการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

เก็บรวบรวมหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ชนิดที่มีศักยภาพดี (ใช้หอยนักล่าสยาม, *Perrottetia siamensis*) สำหรับเป็นแม่พันธุ์ โดยเก็บรวบรวมจากพื้นที่เกษตรกรรมภาคต่างๆ นำตัวอย่างที่ได้มา

วิเคราะห์ชื่อในห้องปฏิบัติการตามระบบอนุกรมวิธานของหอย เปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากบกทั้งในและต่างประเทศ โดยใช้ key ของ Abbott (1989), Vaught (1989), Panha (1996) และ Hemmen and Hemmen (2001)

ดำเนินการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำ โดยทำการศึกษาดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสม ต่อการเจริญเติบโตของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

การทดลองนี้ใช้หอยนักล่าสยาม, *P. siamensis* ซึ่งมีศักยภาพดีและได้คัดเลือกชนิดมาแล้วในปี 2555-2556 ดำเนินการนำโดยหอยตัวห้ำมาเลี้ยงในอ่างซีเมนต์ เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เมตร ในโรงเรือนที่มีอากาศถ่ายเทสะดวก ที่อุณหภูมิ 35 ± 2 องศาเซลเซียส รองพื้นอ่างด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตราส่วน 1:1 ให้สูงจากพื้นอ่างซีเมนต์ ประมาณ 10 เซนติเมตร และวางวัสดุสำหรับให้หอยวางไข่ ได้แก่ กาบมะพร้าวและอิฐแผ่น ให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำวันละ 1ครั้ง ในช่วง 8.00-9.00 น. วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยให้อาหารที่แตกต่างกัน 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ และแต่ละซ้ำใส่หอยตัวห้ำที่มีขนาด 8-9 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดตัวเต็มวัย จำนวน 5 ตัว /ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 หอยดักดาน (ขนาดเปลือก 0.5 เซนติเมตร) จำนวน 20 ตัว

กรรมวิธีที่ 2 อาหารสูตร A จำนวน 10 กรัม

กรรมวิธีที่ 3 อาหารสูตร B จำนวน 10 กรัม

กรรมวิธีที่ 4 หอยดักดาน จำนวน 20 ตัว + อาหารสูตร A จำนวน 10 กรัม

กรรมวิธีที่ 5 หอยดักดาน จำนวน 20 ตัว + อาหารสูตร B จำนวน 10 กรัม

อาหารสูตร A ประกอบด้วย อาหารปลา: รำละเอียด: ผงแคลเซียมคาร์บอเนต (อัตราส่วน 2:1:1)

อาหารสูตร B ประกอบด้วย อาหารปลา: แป้งข้าวโพด: ผงแคลเซียมคาร์บอเนต (อัตราส่วน 2:1:1)

บันทึกผลการทดลอง

- วัดการเจริญเติบโต โดยชั่งน้ำหนักและวัดขนาดเปลือกหอยตัวห้ำ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง
- บันทึกพฤติกรรมการผสมพันธุ์และวางไข่ / จำนวนไข่ ในแต่ละกรรมวิธี
- บันทึกจำนวนหอยดักดาน และปริมาณอาหารกรรมวิธีต่างๆที่หอยตัวห้ำกินแต่ละวัน
- วัดอุณหภูมิโรงเรือน ความชื้นในดินในอ่างเลี้ยงหอย

2.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการฟักไข่และอัตราการรอดของตัวอ่อนหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

นำไข่หอยตัวห้ำ *P. siamensis* มาแยกใส่กล่องพลาสติก ขนาด 15.5 x 22 x 7 เซนติเมตร รองพื้นกล่องพลาสติกด้วยดินผสมขุยมะพร้าว (อบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อฆ่าปรสิตบางชนิด) อัตราส่วน 1:1 ให้หนา 2 เซนติเมตร โดยอาหารที่ใช้ทดลองในช่วงการฟักไข่และเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหอยตัวห้ำทุกกรรมวิธี ให้เป็นอาหารสูตรผสมซึ่งประกอบด้วย อาหารปลา: แป้งข้าวโพด: รำละเอียด: ผงแคลเซียมคาร์บอเนต (อัตราส่วน 1:1:1:1) ที่ดัดแปลงจากสูตรของ ธนพันธ์ (2528) ปริมาณ 2-3 กรัม/สัปดาห์ โดยเก็บเศษอาหารเก่าทิ้งทุกครั้งที่เปลี่ยนอาหารใหม่แต่ละครั้ง ให้ความชื้นโดยฉีดพ่นน้ำวันละ 1

ดำเนินการทดลอง 2 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ แต่ละซ้ำใส่ไข่หอยตัวห้ำจำนวน 1 กลุ่มไข่ (cluster) / กล่อง โดยกำหนดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นกรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ฟักไข่ในสภาพโรงเรือน

กรรมวิธีที่ 2 ฟักไข่ในสภาพห้องปฏิบัติการ (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)

บันทึกผลการทดลอง ดังนี้

- บันทึกอุณหภูมิในสภาพโรงเรือน ของกรรมวิธีที่ 1 ตลอดการทดลอง
- บันทึกจำนวนไข่แต่ละ cluster เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่หอยตัวห้ำแต่ละกรรมวิธี

- บันทึกจำนวนตัวอ่อนของหอยตัวห้ำที่ฟักจากไข่ เพื่อคำนวณอัตราการรอดในแต่ละกรรมวิธี
- วัดการเจริญเติบโต โดยชั่งน้ำหนักและวัดขนาดเปลือกตัวอ่อนหอยตัวห้ำ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เพื่อจัดทำแผนภูมิการเจริญเติบโต

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558 รวม 2 ปี

สถานที่ : พื้นที่เกษตรกรรมและป่าธรรมชาติ ตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย

: ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

การทดลอง 4.1.5การสำรวจปรสิตในหอยวงศ์ Ariophantidae

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างหอยทากบก ได้แก่ กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ สเปรย์ฉีดน้ำ ถุงมือแพทย์ คีมคีบ ไฟฉาย พู่กัน กระดาษทิชชู่ และกระดาษเอนกประสงค์

2. เครื่องมือวัดขนาด ได้แก่ไม้บรรทัดเวอร์เนียร์ ocularmicrometer และ stage micrometer

3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ได้แก่ ชุดผ่าตัด ถาดพาราฟิน แว่นขยายบีกเกอร์ จานแก้ว หลอดหยด กรวยแก้ว เครื่องปั่น ขวดเก็บตัวอย่าง สไลด์ แผ่นปิดสไลด์และผ้าก๊อซ

4. สารเคมี ได้แก่ ผงเปปซินแอลกอฮอล์ แมกนิเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (HCl)

5. อาหารสำหรับเลี้ยงหอยทาก ได้แก่ อาหารเม็ด และผักสด

6. อุปกรณ์ประกอบการถ่ายภาพ ได้แก่ กล้องถ่ายภาพดิจิทัล กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

7. อาหารสำหรับเลี้ยงหอยทาก ได้แก่ ผักสด และอาหารเม็ด

วิธีการ

1. การสำรวจ เก็บตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างหอยทากบก

1.1 สำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Ariophantidaeโดยทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 เดือน ตามพื้นที่ๆ กำหนด เช่น ในสภาพป่า พื้นที่เกษตรกรรม ในเขตภาคต่างๆ ของประเทศไทยและนำหอยทากบกมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร โดยเตรียมตู้กระจกขนาด 25x40x26 เซนติเมตร รองพื้นตู้กระจกด้วยดินผสมขุยมะพร้าว อัตราส่วน 1:1 ให้สูงจากพื้นตู้กระจกประมาณ 5 เซนติเมตร ให้อาหารเป็นผักกาดและให้ความชื้นแก่หอยโดยฉีดพ่นน้ำวันละ 1 ครั้ง เพื่อรอการจำแนกชนิดและทดลองในขั้นต่อไป

1.2 นำตัวอย่างหอยทากบกที่ได้มาจำแนกชนิดตามหลักอนุกรมวิธานของหอยเปรียบเทียบกับเอกสารหอยทากบกทั้งในและต่างประเทศ ตามวิธีการของ Abbott (1989), Panha (1996)และHemmen and Hemmen (2001)

1.3 แยกตัวหอยออกจากเปลือก โดยนำหอยแช่ใน $MgCl_2$ 5% เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2. การเตรียมน้ำย่อยเปปซิน

2.1 เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก โดยละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 7 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 993 มิลลิลิตร

2.2 ละลายผงเปปซิน5 กรัมในสารละลายไฮโดรคลอริกที่เตรียมไว้

3. การตรวจหาปรสิตในหอยโดย Digestion technique(Cheng and Alicata, 1965)

3.1 นำเนื้อหอยใส่ในเครื่องปั่นที่มีน้ำย่อยเปปซิน150 มิลลิลิตร และปั่นโดยใช้เวลา 45 วินาทีจากนั้นนำมากรองผ่านผ้าก๊อซ4 ชั้น โดยเก็บสารละลายที่ผ่านการกรองไว้

3.2 นำสารละลายดังกล่าวมาตรวจหาปรสิตใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ และเก็บรักษาตัวอย่างปรสิตที่พบโดยการ fix ในแอลกอฮอล์ 70%

3.3 นำปรสิตมาแยกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง ตามวิธีการของ Andrassy (1983) และ Grewal *et al.* (2005)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลทางกายภาพของสถานที่เก็บตัวอย่าง
- บันทึกขนาด ลักษณะ และชนิดของหอยทากที่เก็บตัวอย่าง
- บันทึกขนาด ลักษณะ และจำแนกชนิดปรสิตที่พบในตัวอย่างหอยทากพร้อมทั้งถ่ายภาพ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา :เริ่มต้น ตุลาคม 2557 สิ้นสุด กันยายน 2558 รวม 1 ปี

สถานที่ :พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ป่าธรรมชาติตามภาคต่างๆ ของประเทศไทย
ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

กิจกรรมย่อยที่ 4.2 การควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี

การทดลองที่ 4.2.1ศักยภาพของฝอยทองในการควบคุมขี้ไก่ย่าน

วิธีดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์ :

1. ท่อนพันธุ์ขี้ไก่ย่าน
2. ต้นพันธุ์ลำไย ความสูงเฉลี่ย 50 เซนติเมตร
3. ต้นฝอยทองชนิดมีเมล็ด และต้นฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ด พร้อมพืชอาศัย (ต้นหญ้าดอกขาว หรือบาหยา)
4. วงซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 85 เซนติเมตร และ กะบะซีเมนต์สี่เหลี่ยมขนาด 73 x 83 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร พร้อมดินผสมเสร็จ
5. ไม้ไผ่รวก

วิธีการ :

การทดลองที่ 1 การใช้ฝอยทองควบคุมต้นขี้ไก่ย่าน วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 9 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ดังนี้

ชิ้นส่วนฝอยทอง	จำนวนกิ่งของพืชอาศัยที่มีฝอยทองติดอยู่ที่ใช้เบียน			
ฝอยทองชนิดมีเมล็ด	1	2	3	4
ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ด	1	2	3	4
ไม่ปล่อยฝอยทอง	0			

ปลูกต้นหญ้าดอกขาวใช้เป็นพืชอาศัยของฝอยทอง รวบรวมต้นฝอยทองชนิดมีเมล็ดจากแถบที่มีการระบาดในเขตจังหวัดเชียงใหม่ และต้นฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดจากบริเวณจังหวัดนครปฐม นำมาขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนสำหรับนำมาใช้ทดลอง รวบรวมท่อนพันธุ์ขี้ไก่ย่านจากแหล่งระบาดอำเภอบางกรวย

จังหวัดนนทบุรี โดยคัดเลือกจากแหล่งที่ต้นสมบูรณ์ ไม่มีปัญหาโรคและแมลงรบกวน คัดเลือกลำต้นไม่อ่อนหรือแก่เกินไปขนาดเท่าๆ กัน แต่ละท่อนมีจำนวนข้อ 3 ข้อ เลือกข้อที่ไม่มีราก เตรียมดินผสมใส่วงซีเมนต์ปลูกต้นขี้ไก่ย่าน วงละ 10 ท่อนพันธุ์ ดูแลรดน้ำ และตามกำจัดวัชพืชอื่นๆ ออกให้หมด เมื่ออายุ 1 เดือน ถอนแยกออกโดยคัดเลือกต้นที่แข็งแรงสมบูรณ์เอาไว้ วงละ 4 ต้น ปักเสาไม้ให้ต้นขี้ไก่ย่านพัน และดูแลให้ยอดของขี้ไก่ย่านพันอยู่ในพื้นที่ของตัวเอง โดยปักกระโจมไม้ไผ่รวกเป็นหลักให้ต้นขี้ไก่ย่านพัน เมื่อต้นขี้ไก่ย่านมีอายุ 80 วัน จึงปล่อยฝอยทองเบียน โดยใช้กิ่งของพืชอาศัยที่มีฝอยทองติดอยู่จำนวนกิ่งตามกรรมวิธีที่กำหนด

การบันทึกข้อมูล

ใช้ฝอยทองเบียนขี้ไก่ย่านบันทึกภาพการเจริญเติบโตของฝอยทอง นาน 120 วัน เก็บเกี่ยวต้นขี้ไก่ย่านทั้งส่วนที่ยังมีชีวิตละส่วนที่แห้ง นำมาแยกเอาต้นฝอยทองออกทั้งส่วนที่ยังมีชีวิต และส่วนที่แห้งแล้วนำมาชั่งน้ำหนักแห้ง รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 2 วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 8 ซ้ำ ดังนี้

1. ใช้ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไย
2. ใช้ฝอยทองชนิดมีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไย
3. ปล่อยต้นขี้ไก่ย่านขึ้นปกคลุมต้นลำไย
4. ต้นลำไยไม่ถูกขี้ไก่ย่านปกคลุม

ย้ายปลูกต้นลำไย กระถางละ 1 ต้น พร้อมๆกับปลูกขี้ไก่ย่านแซม ดูแลไม่ให้ต้นขี้ไก่ย่านพันต้นลำไย การทดลองมี 2 ชุด คือ 1)ต้นขี้ไก่ย่าน 4 ต้น/ลำไย 1 ต้น 2)ต้นขี้ไก่ย่าน 2 ต้น/ลำไย 1 ต้น พร้อมกันนั้นเลี้ยงต้นฝอยทองทั้ง 2 ชนิดบนต้นหญ้าดอกขาว หลังปลูก 2 เดือนเมื่อต้นลำไยแข็งแรงสมบูรณ์ดี จึงปล่อยต้นขี้ไก่ย่านให้ขึ้นพันต้นลำไย ประมาณ 1 เดือนต้นขี้ไก่ย่านขึ้นปกคลุมต้นลำไยเต็มที่ เริ่มการทดลองโดยปล่อยฝอยทอง 2 ชนิดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นรบกวนต้นลำไย ใช้ต้นลำไย 1 ต้น/ต้นฝอยทอง 2 ต้น/กรรมวิธี

การบันทึกข้อมูล

ใช้การบันทึกภาพการเจริญเติบโตของฝอยทอง วัดความสูงต้นลำไยที่ 1, 2 และ 3 เดือนหลังปล่อยฝอยทองเบียน ตัดต้นลำไยชั่งน้ำหนักต้น นับจำนวนทางใบ ที่ 3 เดือนหลังปล่อยฝอยทองเบียน รวบรวมข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลอง

เวลาและสถานที่ :

ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2555 ทำการทดลองที่เรือนทดลองของกลุ่มวิจัยวัชพืช

การทดลองที่ 4.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของถั่วคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียมต่อการควบคุมหญ้าคา

วิธีดำเนินการทดลอง

- อุปกรณ์ **:**

ต้นปักชำของถั่วซีรูเลียม ปุ๋ยเคมี ถุงกระดาษ และถุงพลาสติก

- วิธีการ:

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ ประกอบด้วย จำนวนต้นของถั่วซีรูเลียม 1, 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร วิธีตัดวัชพืช และไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม การปฏิบัติการทดลองในพื้นที่ปลูกไม้ผลที่มีหญ้าคาและวัชพืชอื่นขึ้นอยู่ ขนาดแปลง 4x4 เมตร หลังตัดหญ้าคาแล้วจึงขุดหลุมปลูกต้นถั่วซีรูเลียมตามอัตราที่กำหนด และทำการดูแลรักษาต้นถั่วซีรูเลียมเหมือนพืชปลูกอื่นๆ

- การบันทึกข้อมูล :

เก็บข้อมูล ประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช เปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่ทั้งหมด จำนวนและน้ำหนักหญ้าคา นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ อธิบายผลและเขียนรายงานผลการทดลอง

- เวลาและสถานที่ (เริ่มต้น-สิ้นสุด) :

ตุลาคม 2553 ถึง มกราคม 2556 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการลพบุรี จังหวัดลพบุรี

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Result and Discussion)

กิจกรรมที่ย่อย 4.1 การควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธี

การทดลองที่ 4.1.1การผลิตและการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว*Sarcocystis singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู

ผลการทดลอง

<u>การทดลองย่อยที่ 1</u> เปรียบเทียบการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน ในน้ำดื่มสะอาดมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 97.82, 81.58, 68.62, 67.62, 39.84, 16.48 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 1 ปี, 2 ปี และ 2 ปี 6 เดือน ไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งน้อยกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อีกทั้งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 1 ปี, 2 ปี และ 2 ปี 6 เดือน มากกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ส่วนการเก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 97.72, 88.18, 79.34, 74.96, 52.74, 30.94 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 6 เดือน, 1 ปี และ 2 ปี นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 6 เดือนและ 1 ปี มากกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในขณะที่การเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่ระยะเวลานานสองปีขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้เช่นเดียวกันในทั้งสองวิธี โดยค่าเฉลี่ยในการทำให้หนูทดลองป่วยตายที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี และ 2 ปี นั้นเท่ากับ 100, 100, 45 และ 100, 70, 35 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาดังนี้

Baver และ Maleckar, 1981 รายงานว่า ความแข็งแรงและความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคโดยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* นั้นขึ้นกับการเก็บรักษา โดยปกติแล้วสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* สามารถเก็บรักษาในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4-10°c ได้นาน 2 ปีและยังสามารถทำให้หนูที่ได้รับสปอร์โรซีสต์เข้าไปเป็นโรคได้

Haefner, 1984 รายงานว่า จำนวนสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาไม่เกิน 4 อาทิตย์ จำนวนสปอร์โรซีสต์เพียง 200-300 สปอร์โรซีสต์และ 350-500 สปอร์โรซีสต์ สามารถทำให้หนูนอร์เวและหนูพุกใหญ่ติดเชื้อได้ตามลำดับ แต่ถ้าเก็บรักษานาน 4-6 เดือนไปใช้ พบว่าความแข็งแรงและความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูจะลดลง ทำให้ต้องใช้สปอร์โรซีสต์มากขึ้นจึงจะทำให้หนูนอร์เวและหนูพุกใหญ่ติดเชื้อได้

Elsheikha และคณะ, 2004 ได้ทำการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ตั้งแต่ปี 1996-2002 ที่อุณหภูมิ 4 °c และนำมาทดสอบการมีชีวิตโดยการย้อมด้วย Propidium iodide (PI) พบว่า แม้ว่าสามารถเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ให้ยังคงมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4 °c เป็นเวลานาน 7 ปี แต่ไม่สามารถทำให้เกิดซีสต์ในหนูทดลองที่สัตว์อาศัยตัวกลางได้ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในโปรโตซัวสกุลนี้ไม่ได้สัมพันธ์กับการสร้างซีสต์ ในหนูทดลองที่เป็นสัตว์อาศัยตัวกลาง แต่ระยะเวลาและอายุของสปอร์โรซีสต์ เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างซีสต์ในสัตว์อาศัยตัวกลาง ซึ่งเมื่อระยะเวลาและอายุของสปอร์โรซีสต์มากขึ้นส่งผลให้การสร้างซีสต์ในสัตว์อาศัยตัวกลางลดลงตามอายุของสปอร์โรซีสต์ที่มากขึ้น

จากรายงานผลงานวิจัยทั้ง 3 เรื่องนั้นแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* และ *S. singaporensis* นั้นจะค่อยๆ ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ และการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ไม่ได้สัมพันธ์กับการสร้างซีสต์ในหนูทดลองที่เป็นสัตว์อาศัยตัวกลาง อีกทั้งการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณหภูมิ 4-10 °c ซึ่งนับว่าเป็นระยะเวลาที่ค่อนข้างสั้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีที่มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานกว่ามาก ดังนั้นในการทดลองย่อยที่ 1 จึงสามารถสรุปได้ว่าสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์สามารถเก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ได้นาน 2 ปี โดยที่ภายในระยะเวลา 1 ปี สปอร์โรซีสต์มีชีวิตอยู่ได้และยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรค ทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ 100 % หากเก็บรักษามากกว่า 2 ปีขึ้นไป ไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้

<u>การทดลองย่อยที่ 2</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวโดยวิธี Sugar flotation

ผลจากการทดลองเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S.singaporensis* โดยวิธีการปั่นล้างน้ำตาล (Sugar flotation) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 95.57, 80.83, 77.07, 60.07, 53.40 และ 48.27 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ระยะเวลา 6 เดือน และ 1 ปี นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติซึ่งมากกว่าและแตกต่างกับค่าเฉลี่ยที่ระยะเวลา 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของ สปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ทำการเก็บรักษาโดยวิธี Sugar flotation นั้นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ค่อยๆลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่มากขึ้น เช่นเดียวกับวิธีการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในการทดลองย่อยที่ 1 แม้ว่าการล้างน้ำตาลในการทดลองนี้สามารถ ทำให้สปอร์โรซีสต์ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์สูงกว่าการปั่นล้างแบบธรรมดา แต่ก็ทำให้ปริมาณสปอร์โรซีสต์ที่สูญเสียไปกับการล้างมากด้วยเช่นกัน ทำให้ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์โรซีสต์ไม่เพียงพอต่อระดับที่ทำให้หนูทดลองติดเชื้อป่วยและตายได้ (Lethal dose) 200,000 สปอร์โรซีสต์ สำหรับการหยอดลงในเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู 1 ก้อน

<u>การทดลองย่อยที่ 3</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในไนโตรเจนเหลว

ผลจากการทดลองเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen, N_2) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน พบว่า ในระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน และ 1 ปี สามารถทำให้หนูทดลองป่วยตายได้ทั้งหมด (100%) แต่เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลามากกว่า 1 ปี นั้นไม่สามารถทำให้หนูทดลองที่ติดเชื้อป่วยและตายได้ ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Fayer และ Nerod, 1996 ที่พบว่า ในน้ำที่ผ่านการเป็นน้ำแข็งแล้ว โอโอซีสต์ของโปรโตซัว *Cryptosporidium pavum* สามารถมีชีวิตและยังทำให้เกิดโรคได้และโอโอซีสต์จะมีชีวิตและมี Infectivity ที่ยาวนานขึ้น ถ้าอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำมาก แต่เนื่องจากการทดลองในครั้งไม่ได้ทำการทดลองหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ภายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ที่มีสภาพทำให้น้ำเป็นน้ำแข็งเช่นเดียวกับการทดลองของ Fayer และ Nerod เนื่องจากการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในไนโตรเจนเหลวนั้นต้องสลายสปอร์โรซีสต์ให้แตกออกมาเป็นสปอร์โรซอยด์ก่อน ดังนั้นเมื่อทำการย้อมสีเพื่อดูการมีชีวิตจึงไม่สามารถคำนวณกลับมาเป็นจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่แท้จริงได้ อีกทั้งอาจเป็นไปได้ว่าโปรโตซัวที่ทำการทดลองนั้นเป็นคนละชนิดกันแม้ว่าจะเป็นโปรโตซัวในกลุ่ม Apicomplexa กลุ่มเดียวกัน (Hikosaki และคณะ, 2010) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าสารประกอบต่างๆภายในสปอร์โรซีสต์อาจแตกต่างกัน อีกทั้งการทดลองของ Fayer และ Nerod ไม่ได้เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ด้วยสาเหตุ

เหล่านี้จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกันก็อาจเป็นได้ ดังนั้นการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นวิธีการที่ต้องเสียค่าใช้จ่ายมากในการเติมไนโตรเจนเหลวลงถังเก็บทุก 2 เดือน อีกทั้งยังไม่สามารถทำให้สปอร์โรซีสต์คงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองในระยะเวลานานมากกว่า 1 ปี ได้ จึงเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ให้คงประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูได้

ด้วยเหตุนี้เองจึงกล่าวโดยสรุปได้ว่าการศึกษาในครั้งนี้ได้วิธีการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ทำให้สปอร์โรซีสต์มีชีวิตอยู่ได้และยังคงประสิทธิภาพในการก่อโรค ทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ 100 % ที่ระยะเวลา 1 ปี แม้ว่าระยะเวลาการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ระยะเวลา 2 ปี นั้นสามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้แต่ประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองนั้น จะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเปอร์เซนต์การมีชีวิตของของสปอร์โรซีสต์

การเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอรีโรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดหรือในสารละลายเกลือ PBS 1% ซึ่งเป็นวิธีที่ทางกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรฯ ใช้ในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์อยู่ในปัจจุบันนี้ เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่ายและ ไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในมากนัก จึงเหมาะสำหรับใช้ในการเก็บรักษาเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ทำเป็นงานประจำ ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

อย่างไรก็ดีแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้จะสิ้นสุดลงแต่ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ควรที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับงานวิจัย ต่อยอดสำหรับการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ต่อไป เพื่อทำให้สามารถเก็บรักษาหัวเชื้อสปอร์โรซีสต์ได้เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูง นำไปสู่การควบคุมและลดปริมาณหนูศัตรูพืชแบบบูรณาการร่วมกับวิธีการอื่นๆที่ไม่ใช้สารเคมี ทำให้สามารถป้องกันและกำจัดหนูศัตรูพืชรวมไปถึงหนูที่สร้างปัญหาในด้านต่างๆได้อย่างยั่งยืนและมีประสิทธิภาพ ไม่มีพิษตกค้างสู่สิ่งแวดล้อมเพื่อความปลอดภัยของมนุษย์และสิ่งแวดล้อมต่อไป

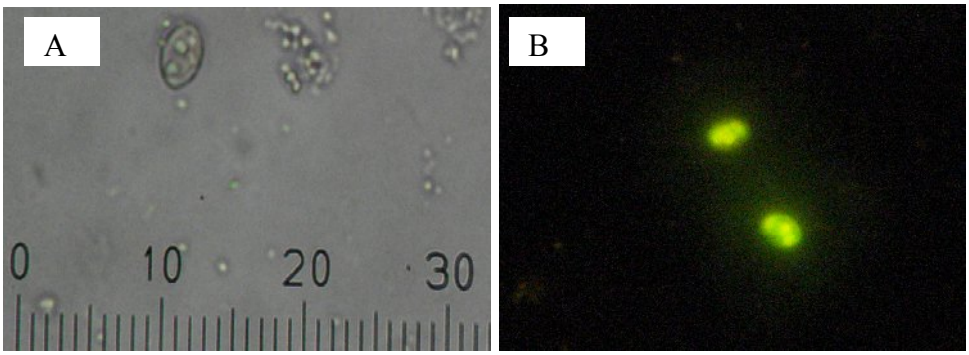


Figure 1 Sporocyst characterized of *S. singaporensis* at magnification 40x and figure (1A). The sporocyst of *S. singaporensis* stain with nucleic stain at magnification 40x was used to differentiate between unstained sporocysts; viable and stained; death (1B).

Table 1 The table showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained in clean drinking water.

Sporocyst samples	The percentage of viable sporocysts in clean drinking water							CV (%)
	0 day	6 month	1 Year	2 Year	2 Year 6 Month	3 Year	3 Year 6 Month	
S16	100	96.9	78.6	64.3	83.5	42.9	26.7	15.6
S162	100	99	69.2	50	66.7	28.6	15.9	
S54	100	100	80	81.3	84	36.4	7.6	
SM1	98.4	100	93.3	62.9	65.8	52.9	17.9	
SM2	100	93.2	86.8	84.6	38.1	38.4	14.3	
Means	99.68[a]	97.82[a]	81.58[b]	68.62[b]	67.62[b]	39.84[c]	16.48[d]	

[1/] = Means in column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

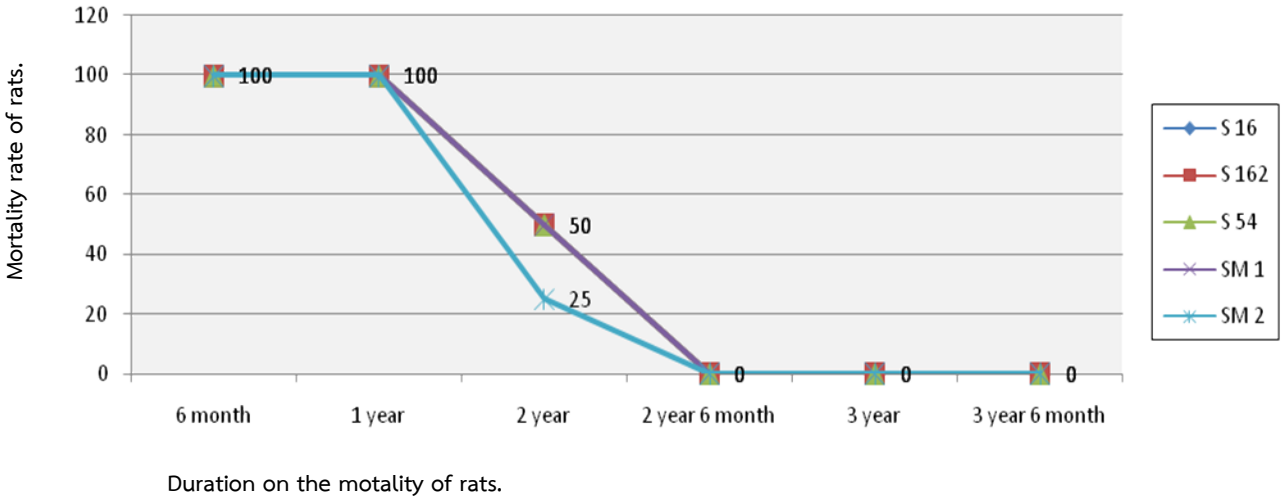


Figure 2 The graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* maintained in clean drinking water.

Table 2 The table showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained in 1% PBS.

Sporocyst samples	The percentage of viable sporocysts in 1% PBS							CV (%)
	0 day	6 month	1 Year	2 Year	2 Year 6 Month	3 Year	3 Year 6 Month	
S16	100	93.8	80	82.4	68.8	76.5	45.3	12.9
S162	99.1	100	89.3	84.6	82.4	65.2	25.4	
S54	100	100	100	89.6	86.8	42.9	22.5	
SM1	100	96.4	88.2	78.1	66.7	33.6	28.1	
SM2	98	98.4	83.4	62	70.1	45.5	33.4	
Means	99.42[a]	97.72[a]	88.18[ab]	79.34[bc]	74.96[c]	52.74[d]	30.94[e]	

1/ = Means in column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

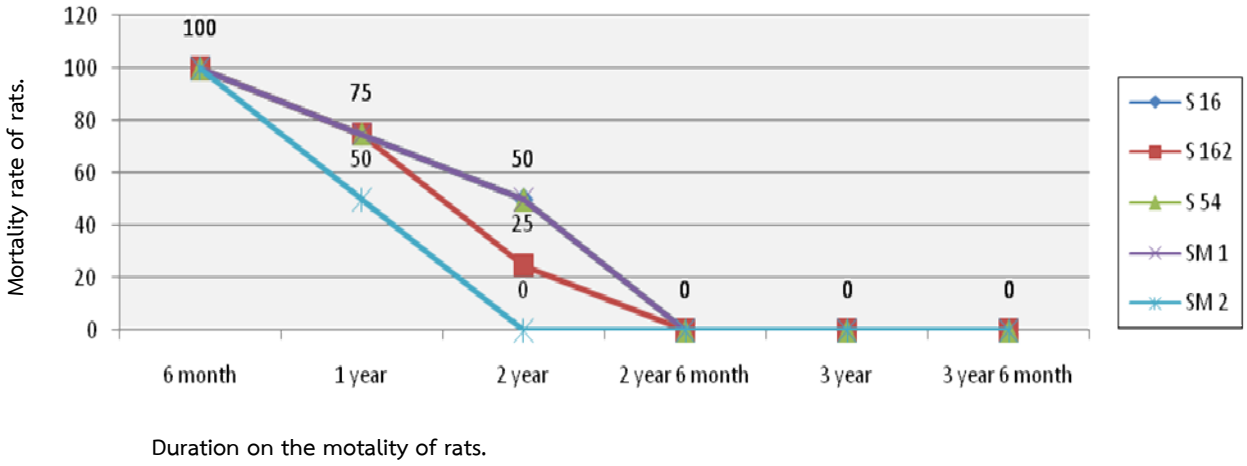


Figure 3 The Graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* maintained in 1% PBS.

Table 3 The table showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained by sugar flotation method.

Sporocyst samples	The percentage of viable sporocysts maintained by sugar flotation method							CV (%)
	0 day	6 month	1 Year	2 Year	2 Year 6 Month	3 Year	3 Year 6 Month	
S42	100	98.2	90	85.6	76.1	71.2	53	14.1
S15	98.2	90.7	72.3	73.3	62.2	48.7	49.8	
S4	94.4	97.8	80.2	72.3	41.9	40.3	42	
Means	97.53[a]	95.57[ab]	80.83[ab]	77.07[bc]	60.07[cd]	53.4[d]	48.27[d]	

[1/] = Means in column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

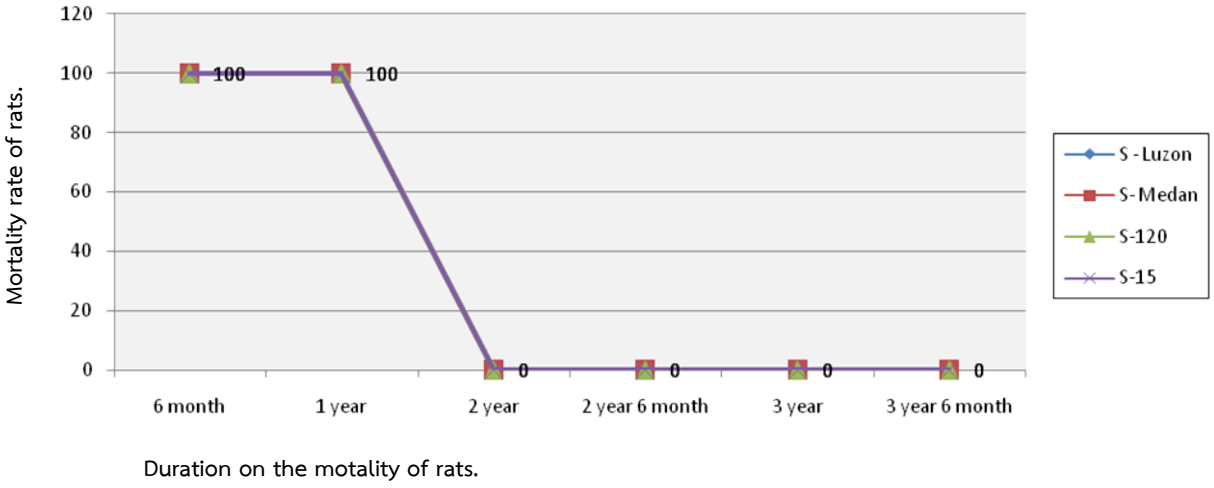


Figure 4 The graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* stored in liquid nitrogen (N_2).

การทดลองที่ 4.1.2 ศึกษาประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย*Steinernema* sp. ควบคุมทากพามาริออน *Parmarion* sp.

ผลการทดลอง

การทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย *Steinemema carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* กับ ทากพามาริออน *Parmarion* sp. ใน ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ตามแผนการทดลอง CRD จำนวน 7 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ โดยใช้ *S. carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* แต่ละชนิด อัตรา 100,000 และ 200,000 ตัวต่อ กล่อง.และ กรรมวิธีไม่พ่นสาร โดยคัดแยกทากพามาริออน ที่สมบูรณ์ใส่กล่อง ขนาด 6 x 10 x 3 เซนติเมตร กล่องละ 5 ตัว แล้วให้อาหารปลาชนิดเม็ดเก็บไว้ 1 คืน จึงทำการทดลองด้วยการพ่นไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดตามอัตราที่กำหนด ตามแผนการทดลองลงในกล่อง หลังทดสอบ ตรวจนับหอย และทำการทดลองซ้ำข้างต้นเพื่อทำการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาด้วยการเก็บทากที่มีชีวิตอยู่หลังทดสอบที่ 24, 48และ 72 ชั่วโมงซ้ำละ 1 ตัว มาคงสภาพด้วยฟอร์มาลีน 10% นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างน้ำประปา นาน 1 ชั่วโมงเก็บไว้ใน แอลกอฮอล 70% นำมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาด้วยการทำสไลด์ถาวรและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า

หลังการทดสอบ 1 วัน พบว่า ทากพามาริออน ที่ทดสอบด้วย *S. carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* แต่ละชนิด อัตรา 100,000 และ 200,000 ตัวต่อ กล่อง.และ กรรมวิธีไม่พ่นสาร ไม่มีทากตายในแต่ละกรรมวิธีคือ 0, 0, 0, 0, 0, 0 และ 0 % ตามลำดับ

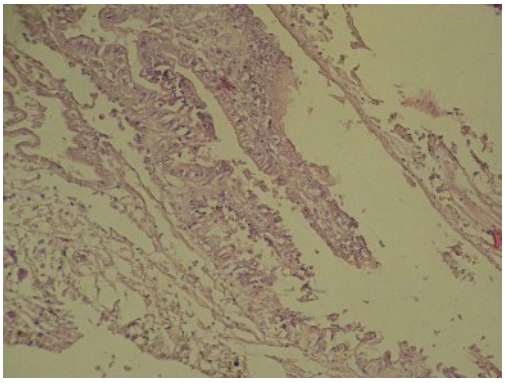
หลังการทดสอบ 2 วัน พบว่า ทากพามาริออน ที่ทดสอบด้วย *S. carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* แต่ละชนิด อัตรา 100,000 และ 200,000 ตัวต่อ กล่อง.และ กรรมวิธีไม่พ่นสาร ไม่มีทากตายในแต่ละกรรมวิธีคือ 0, 0, 0, 0, 0, 0 และ 0 % ตามลำดับ

หลังการทดสอบ 3 วัน พบว่า ทากพามาริออน ที่ทดสอบด้วย *S. carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* แต่ละชนิด อัตรา 100,000 และ 200,000 ตัวต่อ กล่อง.และ กรรมวิธีไม่พ่นสาร ไม่มีทากตายในแต่ละกรรมวิธีคือ 0, 0, 0, 0, 0, 16.66 และ 0 % ตามลำดับ

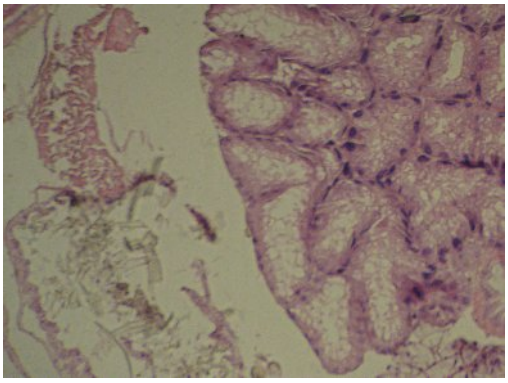
ผลการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อนำเนื้อเยื่อ อวัยวะระบบทางเดินอาหาร อวัยวะระบบสืบพันธุ์ และ ระบบทางเดินหายใจ ของทากมาตรวจภายใต้กล้องจุทรรศน์ ปรากฏว่าไม่พบไส้เดือนฝอยในช่องว่างของลำตัวทั้งระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดินหายใจ และอวัยวะระบบสืบพันธุ์ของทาก และเซลล์และเนื้อเยื่อ อวัยวะระบบทางเดินอาหาร อวัยวะระบบสืบพันธุ์ และ ระบบทางเดินหายใจ เป็นปกติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุมที่ไม่ใช้ไส้เดือนฝอย จึงเป็นการบ่งบอกหรือพิสูจน์ได้ว่าไส้เดือนฝอยที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพกับทากพามาริออนนั้น ไม่สามารถเข้าไปในตัวทากได้ นั่นแสดงว่าไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงเหล่านี้ไม่เฉพาะเจาะจงกับทากพามาริออน ดังภาพ

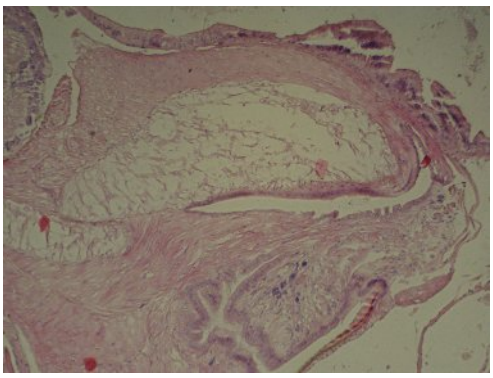
รูปภาพ เนื้อเยื่ออวัยวะของทากพามาริออนที่ทดสอบด้วยไส้เดือนฝอย 3วัน



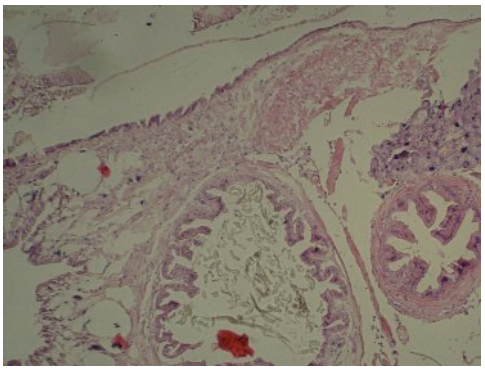
กรรมวิธีควบคุม เนื้อเยื่อทางเดินอาหารปกติ



ไม่พบไส้เดือนฝอย เนื้อเยื่อปกติ



ไม่พบไส้เดือนฝอย เนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร



ไม่พบไส้เดือนฝอย เนื้อเยื่อทางเดินอาหาร

การทดลองที่ 4.2.3 คัดเลือกชนิดและศึกษาพฤติกรรมการกินหอยทาก ของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ในประเทศไทย

ผลการทดลอง

1. <u>การสำรวจและการจำแนกชนิดของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae</u>

(ดำเนินการในปี 2554-2556)

ได้ดำเนินการสำรวจ/ เก็บตัวอย่าง และบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่ๆเก็บตัวอย่างตามแผนการสำรวจ เพื่อนำข้อมูลไปจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ที่มีในประเทศไทย โดยนำข้อมูลที่ได้เก็บรวบรวมมาแล้วบางส่วนเตรียมจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae โดยใช้โปรแกรม Arc Gis และ ArcView ได้สำรวจในพื้นที่ภาคต่างๆ และจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอย ตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001), Naggs (1989), Panha (1996) และ Vaught (1989) ดังนี้

<u>ภาคเหนือ</u> ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง ตาก และนครสวรรค์ ได้ตัวอย่างหอยทาก 84 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้เป็น 9 ชนิด ดังนี้ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Parmarion* sp., *Hemiplecta* sp., *Pyramidulus* sp. *Durgella* sp., *Cryptaustenia* sp., *Haploptychius* sp. และ *Cyclophorus* sp. โดยจัดเป็นหอยทากชนิดที่เป็นศัตรูพืช 3 ชนิด คือ

Cryptozona sp., *Sarika* sp. และ *Parmarion* sp. และเป็นหอยทากตัวห้ำที่อยู่ในวงศ์ Streptaxidae จำนวน 1 ชนิด คือ *Haploptychius* sp. (Figure 1) ซึ่งพบในเขตอุทยานแห่งชาติดอยฟ้าห่มปก จังหวัดเชียงใหม่

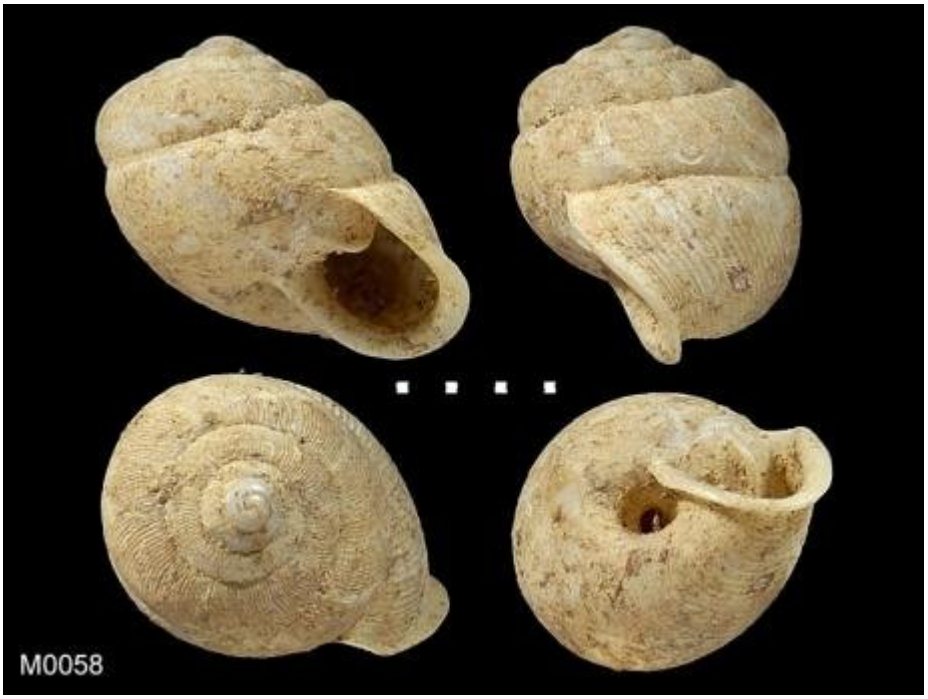
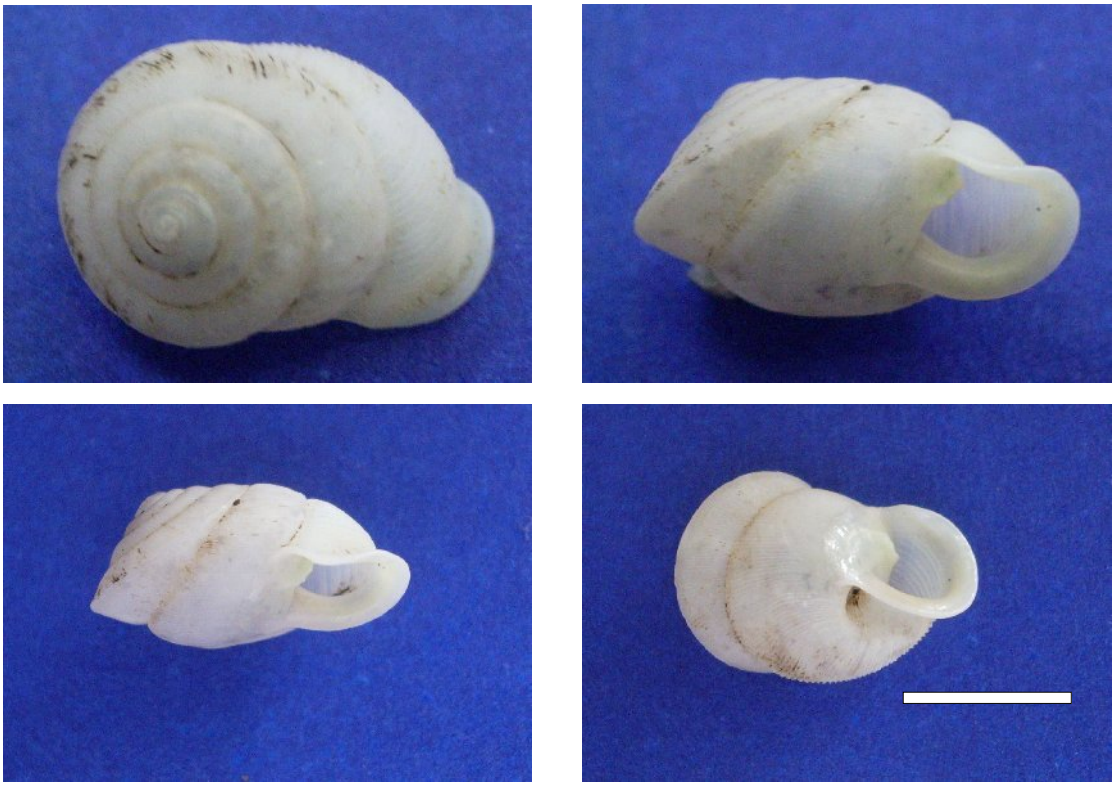


Figure 1 : Shell morphology of *Haploptychius* sp.
(Pictures by http://malaypeninsularsnail.lifedesks.org/

ภาคกลางและภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครนายก สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม ตากกาญจนบุรี และราชบุรี ได้หอยทาก 120 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้เป็น 16 ชนิด ดังนี้ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Parmarion* sp., *Hemiplecta* sp., *Cyclophorus* sp., *Megaustenia* sp., *Durgella* sp., *Cryptaustenia* sp., *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) ,*Oophana* sp., *Lamellaxis gracilis, Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens* และ *Amphidromus glaucolarynx*
โดยจัดเป็นหอยทากชนิดที่เป็นศัตรูพืช 7 ชนิด คือ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Lamellaxis gracilis, Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens* และ *Parmarion* sp. และพบว่ามีหอยทากที่เป็นหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae 2 species คือ *Haploptychius petitii* (Gould, 1844) (Figure 2) และ *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) (Figure 3 และ Figure 4) และอีก 1 genus คือ *Oophana* sp. (Figure 5)



Bar Scale = 1 C.M.

Figure 2 : Shell morphology of *Haploptychius petitii* (Gould, 1844)

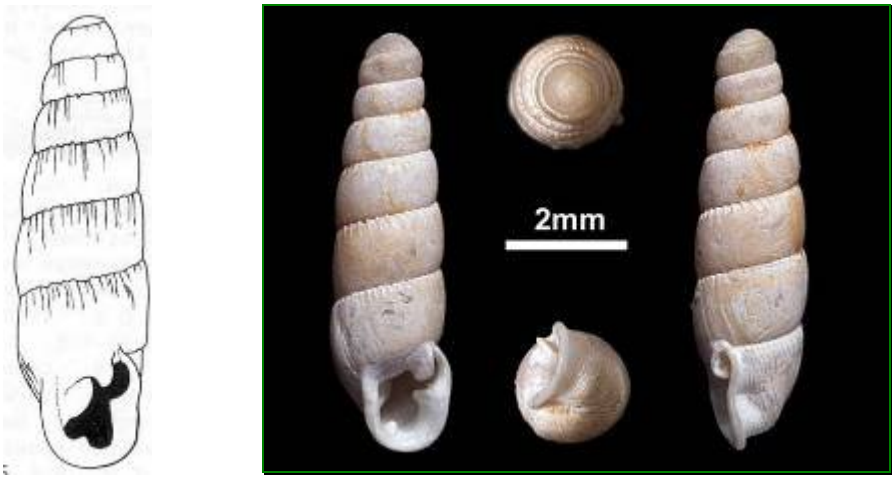
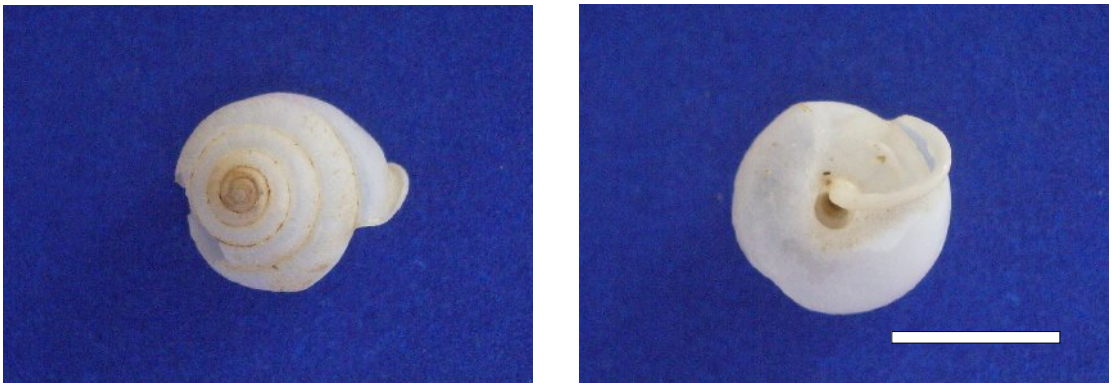


Figure 3 : Shell morphology of *G. bicolor* (Hutton,1834)
(Pictures by http://www.nhm.ac.uk)

Figure 4 : Living specimen of the two-toned snail; *Gulella bicolo*r (Hutton,1834)



Bar Scale = 1 C.M.

Figure 5 : Shell morphology of *Oophana* sp.

<u>ภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือ</u> ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ตราด จันทบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา และนครราชสีมา ได้หอยทาก 138 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้เป็น 16 ชนิด ดังนี้ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Macrochlamys* sp., *Parmarion* sp., *Hemiplecta* sp., *Cyclophorus* sp., *Leptopoma* sp., *Durgella* sp., *Bradybeana* sp., *Gulella bicolor* (Hutton, 1834), *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) *Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens, Amphidromus schomburgki* และ *Amphidromus atricallosus* โดยจัดเป็นหอยทากชนิดที่เป็นศัตรูพืช 6 ชนิด คือ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens* และ *Parmarion* sp. พบหอยตัวห้ำที่อยู่ในวงศ์ Streptaxidae 2 species คือหอยนักล่าสยาม; *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) (Figure 6 และ Figure 7) และหอยนักล่าสีส้ม; *Gulella bicolor* (Hutton, 1834)

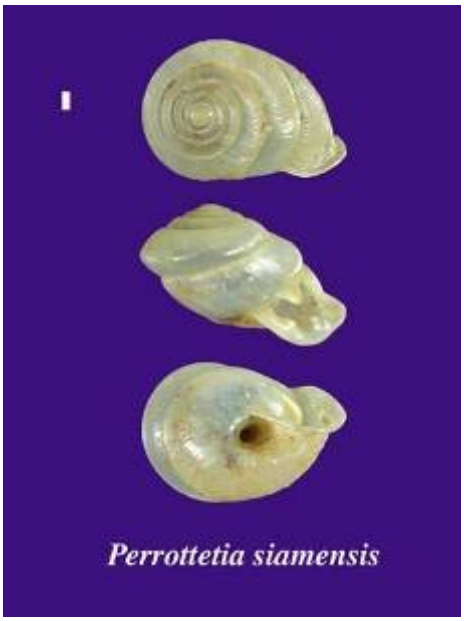
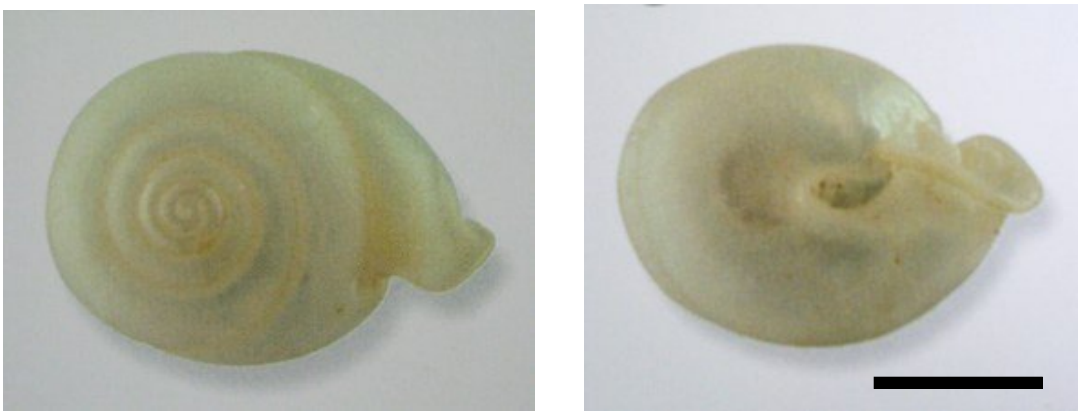


Figure 6 : Shell morphology of *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862)

Figure 7 : Living specimens of *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862)

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร พังงา สงขลา และสุราษฎร์ธานี ได้หอยทาก 184 ตัวอย่าง พบหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae 1 genus คือ *Discartemon* sp. (Figure 8)



Bar Scale = 5 M.M.

Figure 8 : Shell morphology of *Discartemon* sp.

ข้อสังเกต ค่า pH ของดินในพื้นที่ๆเก็บตัวอย่าง อยู่ในช่วง 7.0 - 7.4 โดยส่วนใหญ่พบตัวอย่างหอยตัวห้ำในสภาพที่เป็นภูเขาหินปูน และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 60% ขึ้นไป

และจากการสำรวจ พบว่าจังหวัดที่มีความหลากชนิดของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae มากที่สุด คือ จังหวัดกาญจนบุรี โดยสำรวจพบ 3 genus ได้แก่ *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) และ *Oophana* sp. และจังหวัดที่สามารถเก็บตัวอย่างหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ได้มากที่สุดคือ จังหวัดนครราชสีมา (Figure 9, Figure 10 และ Table1)

Figure 9. : Study areas, Kanchanaburi province : 1. Sai Yok Noi Waterfall 2. Erawan National Park 3. Panom Thuan district 4. Lawa Cave

Figure 10. : Study areas, Nakornratchasima province : 1. Khao Yai National Park 2. Pak Chong district 3. Wang Nam Khiao district

Table 1 : Sample collection sites and sample sizes of predatory snail : Family Steptaxidae

		Abbreviation	Sample size (N)
Gulella bicolor	Kanchanaburi	GbKBW	32
	Chonburi	GbCBE	8
	Samuthsakorn	GbSSaC	10
	Nakhonpathom	GbNPC	3
Perrottetia	Nakornratchasima	PsNRNE	42
	Nakhonnavok	PsNNC	18
Haploptychius	Kanchanaburi	HpKBW	6
Oophana sp.	Kanchanaburi	O-KBW	2
Haploptychius sp.	Chiangmai	H-CMN	3
Discartemon sp.	Phangnga	D-PGS	5
	Songkhla	D-SKS	5
	Chumporn	D-CPS	37
	Suratthani	D-SRS	23

Abbreviations: Gb, *Gulella bicolor* ; Ps, *Perrottetia siamensis* ; Hp, *Haploptychius petitii* ; O -, *Oophana* sp. ; H-, *Haploptychius sp.*; D-, *Discartemon* sp.
N = north, NE= northeast, C = Central region, W= west, S = South

2. ชีววิทยาบางประการ และพฤติกรรมการกินหอยทากของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

(ดำเนินการในปี 2555-2556)

ชีววิทยา

หอยนักล่าสีส้ม; *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) พบว่าเป็นหอยตัวห้ำที่มีเปลือกใสรูปทรงเจดีย์ ขนาดเล็ก 48 - 54 มิลลิเมตร มี 6 - 7 whorls ส่วนลำตัวมี 2 สี คือลำตัวด้านล่างและแผ่นเท้าสีเหลือง ลำตัวส่วนบนสีส้ม ต้องการความชื้นสัมพัทธ์ 60% ขึ้นไป

พฤติกรรมการกิน (feeding behavior)

ศึกษา feeding behavior ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae จำนวน 5 genus ได้แก่ *G. bicolor* (Hutton, 1843), *P. siamensis* (Pfeiffer,1862), *H. petitii* (Gould, 1844), *Oophana* sp. และ *Discartemon* sp. ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร เพื่อคัดเลือกชนิดที่มีศักยภาพมากที่สุดในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยตัวห้ำทุกชนิดมีศักยภาพในการกินหอยและไข่หอยที่มีขนาดใกล้เคียงหรือขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย เช่น หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่งและหอยดักดาน (Figure 11) โดยเฉลี่ยสัปดาห์ละ 2-3 ตัว นอกจากนี้ยังพบพฤติกรรมการไล่ตามเหยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเหยื่อที่มีขนาดเล็กหรืออ่อนแอกว่า โดยพบว่าหอยนักล่าสยาม; *P. siamensis* (Pfeiffer, 1862) มีศักยภาพมากที่สุด กล่าวคือสามารถกินหอยดักดานขนาดเล็ก (น้ำหนักเฉลี่ย 0.07 กรัม ขนาด 6.15 มิลลิเมตร) 1-1.5 ตัว/ วัน และใช้เวลาในการกินเหยื่อเฉลี่ย 3 - 5 นาที/ ตัว

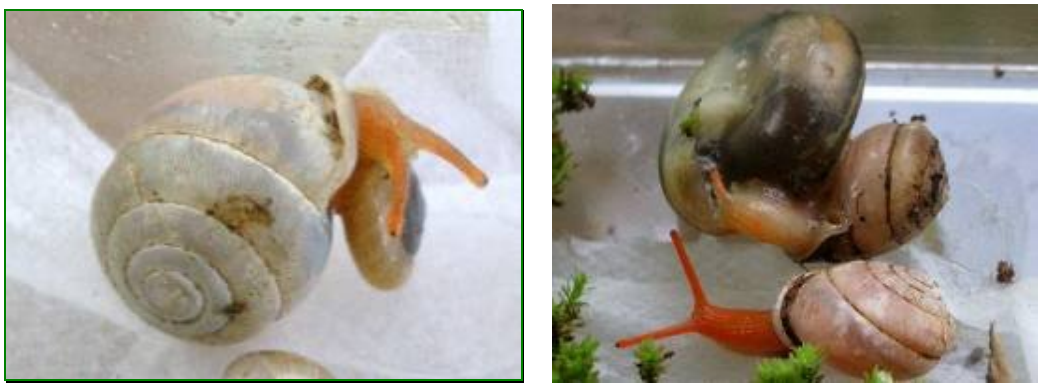


Figure 11 : The predatory snail*; Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) feeding on *Cryptozona* sp.

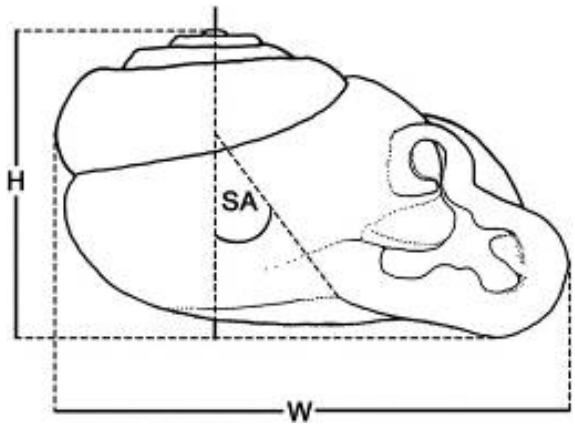


Figure 12: Schematic diagram illustrating methods for measuring specimens: H = shell height, SA = shell angle, W = shell width.

<u>การศึกษาผลกระทบของหอยตัวห้ำต่อสิ่งแวดล้อม</u> โดยทำการทดลองในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร ใส่หอยตัวห้ำ 5 genus และให้อาหารเป็นหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก สังเกตการณ์ทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าหอยตัวห้ำไม่ชอบกินเหยื่อทั้ง 2 ชนิด จึงสรุปว่าหอยตัวห้ำที่สำรวจพบทั้ง 5 genus ไม่มีผลกระทบต่อหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผัก

Table 2 : Lists of predatory land snails, **Family** Streptaxidae which were collected from Thailand including habitat and status. (2010-2013)

Taxonomic Classification	Habitat	Status
Class Gastropoda		
(gastropods, slugs, and snails)		
Subclass Pulmonata		
Order Stylommatophora		
Superfamily : Streptaxoidae		
Family Streptaxidae		
☆ **Genus *Gulella (Huttonella)***		
Species *Gulella bicolor*		
(Hutton,1834)	Ground	Introduced
☆ **Genus *Perrottetia***		
Species *Perrottetia siamensis*		
(Pfeiffer,1862)	Ground	Indigenous
☆ **Genus *Haploptychius***		
Species *Haploptychius petitii*		
(Gould, 1844)	Ground	Indigenous
Species *Haploptychius sp.*	Ground	Indigenous
☆ **Genus *Oophana***		
Species *Oophana* sp.	Ground	Indigenous
☆ **Genus *Discartemon***		
Species *Discartemon* sp.	Ground	Indigenous

การทดลองที่ 4.1.4 ศึกษาการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae เพื่อกำจัดหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี

ผลการทดลอง

1. การสำรวจและการจำแนกชนิดของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

ได้ดำเนินการสำรวจ/ เก็บตัวอย่างหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ในปี 2554-2556_และบันทึกพิกัดภูมิศาสตร์พื้นที่ๆเก็บตัวอย่างตามแผนการสำรวจ เพื่อนำข้อมูลไปจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ที่มีในประเทศไทย โดยนำข้อมูลที่ได้เก็บรวบรวมมาแล้วบางส่วนเตรียมจัดทำแผนที่การกระจายพันธุ์ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae โดยใช้โปรแกรม Arc Gis และ ArcView ได้สำรวจในพื้นที่ภาคต่างๆ และจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอย ตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001), Naggs (1989), Panha (1996) และ Vaught (1989) ดังนี้

ภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง ตาก และนครสวรรค์ ได้ตัวอย่างหอยทาก 84 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้เป็น 9 ชนิด ดังนี้ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Parmarion* sp., *Hemiplecta* sp., *Pyramidulus* sp. *Durgella* sp., *Cryptaustenia* sp.,

Haploptychius sp. และ *Cyclophorus* sp. โดยจัดเป็นหอยทากชนิดที่เป็นศัตรูพืช 3 ชนิด คือ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp. และ *Parmarion* sp. และเป็นหอยทากตัวห้ำที่อยู่ในวงศ์ Streptaxidae จำนวน 1 ชนิด คือ *Haploptychius* sp. (Figure 1) ซึ่งพบในเขตอุทยานแห่งชาติดอยฟ้าห่มปก จังหวัดเชียงใหม่

ภาคกลางและภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดนครนายก สมุทรสาคร สมุทรสงคราม นครปฐม ตากกาญจนบุรี และราชบุรี ได้หอยทาก 120 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้เป็น 16 ชนิด ดังนี้ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Parmarion* sp., *Hemiplecta* sp., *Cyclophorus* sp., *Megaustenia* sp., *Durgella* sp., *Cryptaustenia* sp., *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) ,*Oophana* sp., *Lamellaxis gracilis, Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens* และ *Amphidromus glaucolarynx*
โดยจัดเป็นหอยทากชนิดที่เป็นศัตรูพืช 7 ชนิด คือ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Lamellaxis gracilis, Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens* และ *Parmarion* sp. และพบว่ามีหอยทากที่เป็นหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae 2 species คือ *Haploptychius petitii* (Gould, 1844) (Figure 2) และ *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) (Figure 3 และ Figure 4) และอีก 1 genus คือ *Oophana* sp. (Figure 5)

ภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ตราด จันทบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา และนครราชสีมา ได้หอยทาก 138 ตัวอย่าง นำมาจำแนกชนิดในห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกได้เป็น 16 ชนิด ดังนี้ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Macrochlamys* sp., *Parmarion* sp., *Hemiplecta* sp., *Cyclophorus* sp., *Leptopoma* sp., *Durgella* sp., *Bradybeana* sp., *Gulella bicolor* (Hutton, 1834), *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) *Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens, Amphidromus schomburgki* และ *Amphidromus atricallosus* โดยจัดเป็นหอยทากชนิดที่เป็นศัตรูพืช 6 ชนิด คือ *Cryptozona* sp., *Sarika* sp., *Prosopeas walkeri, Succinea sp., Ovachlamys fulgens* และ *Parmarion* sp. พบหอยตัวห้ำที่อยู่ในวงศ์ Streptaxidae 2 species คือหอยนักล่าสยาม; *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) (Figure 6 และ Figure 7) และหอยนักล่าสีส้ม; *Gulella bicolor* (Hutton, 1834)

ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร พังงา สงขลา และสุราษฎร์ธานี ได้หอยทาก 184 ตัวอย่าง พบหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae 1 genus คือ *Discartemon* sp. (Figure 8)

2. การศึกษาการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae

ได้เตรียมศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์และเจริญเติบโตของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ตามแผนการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยให้อาหารที่แตกต่างกัน 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ และแต่ละซ้ำใส่หอยตัวห้ำที่มีขนาด 8-9 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดตัวเต็มวัย จำนวน 5 ตัว /ซ้ำ ผลการทดลองพบว่ากรรมวิธีที่ 5 ให้อาหารเป็นหอยดักดาน จำนวน 20 ตัว ร่วมกับ อาหารสูตร B จำนวน 10 กรัม ทำให้นักล่าสยาม, *P. siamensis* สามารถขยายพันธุ์และวางไข่ได้ดีที่สุด (Table 2) อย่างไรก็ตาม ในปีต่อไปยังต้องศึกษาชนิดของอาหารที่เหมาะสม ต่อการขยายพันธุ์ และเจริญเติบโตของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ร่วมกับการศึกษาปัจจัยอื่นๆเพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสมยิ่งขึ้น โดยรูปแบบการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำจำเป็นต้องสังเกตการเจริญเติบโตของหอยร่วมกับวิธีการเพาะเลี้ยงหอยชนิดอื่นๆแบบดั้งเดิม ซึ่งในการเพาะเลี้ยงให้ได้จำนวนมากขึ้นจึงมีการเปลี่ยนแปลงธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ขยายผลควบคุมหอยทากศัตรูพืชโดยชีววิธี ต่อไป

ข้อสังเกต :

- pH ของดินในพื้นที่ๆเก็บตัวอย่าง อยู่ในช่วง 7.0 - 7.4 โดยส่วนใหญ่พบตัวอย่างหอยตัวห้ำในสภาพที่เป็นภูเขาหินปูน และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 60% ขึ้นไป

- ระหว่างเดือนเมษายน – กันยายน 2557ได้ตัวอย่างหอยตัวห้ำเพิ่มเติม 2 สกุล จากพื้นที่จังหวัดจันทบุรี 12 ตัวอย่าง และพื้นที่จังหวัดตาก 4 ตัวอย่าง ขณะนี้อยู่ระหว่างตรวจสอบชนิด

- จากการสำรวจ พบว่าจังหวัดที่มีความหลากชนิดของหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae มากที่สุดคือจังหวัดกาญจนบุรี โดยสำรวจพบ 3 genus ได้แก่ *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Gulella bicolor* (Hutton, 1834) และ *Oophana* sp. และจังหวัดที่สามารถเก็บตัวอย่างหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ได้มากที่สุดคือ จังหวัดนครราชสีมา (Figure 9, Figure 10 และ Table1)

พฤติกรรมการกิน (feeding behavior)

ศึกษา feeding behavior ของหอยทากตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae จำนวน 5 genus ได้แก่ *G. bicolor* (Hutton, 1843), *P. siamensis* (Pfeiffer,1862), *H. petitii* (Gould, 1844), *Oophana* sp. และ *Discartemon* sp. ในห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร เพื่อคัดเลือกชนิดที่มีศักยภาพมากที่สุดในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยตัวห้ำทุกชนิดมีศักยภาพในการกินหอยและไข่หอยที่มีขนาดใกล้เคียงหรือขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย เช่น หอยซัคซิเนีย หอยเลขหนึ่งและหอยดักดาน (Figure 11) โดยเฉลี่ยสัปดาห์ละ 2-3 ตัว นอกจากนี้ยังพบพฤติกรรมการไล่ตามเหยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเหยื่อที่มีขนาดเล็กหรืออ่อนแอกว่า โดยพบว่าหอยนักล่าสยาม; *P. siamensis* (Pfeiffer, 1862) มีศักยภาพมากที่สุด กล่าวคือสามารถกินหอยดักดานขนาดเล็ก (น้ำหนักเฉลี่ย 0.07 กรัม ขนาด 6.15 มิลลิเมตร) 1-1.5 ตัว/ วัน และใช้เวลาในการกินเหยื่อเฉลี่ย 3 - 5 นาที/ ตัว ผลกระทบของหอยตัวห้ำต่อสิ่งแวดล้อม โดยทำการทดลองในกล่องพลาสติก ขนาด 15.5x22x7 เซนติเมตร ใส่หอยตัวห้ำ 5 genus และให้อาหารเป็นหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก สังเกตการณ์ทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าหอยตัวห้ำไม่ชอบกินเหยื่อทั้ง 2 ชนิด จึงสรุปว่าหอยตัวห้ำที่สำรวจพบทั้ง 5 genus ไม่มีผลกระทบต่อหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผัก

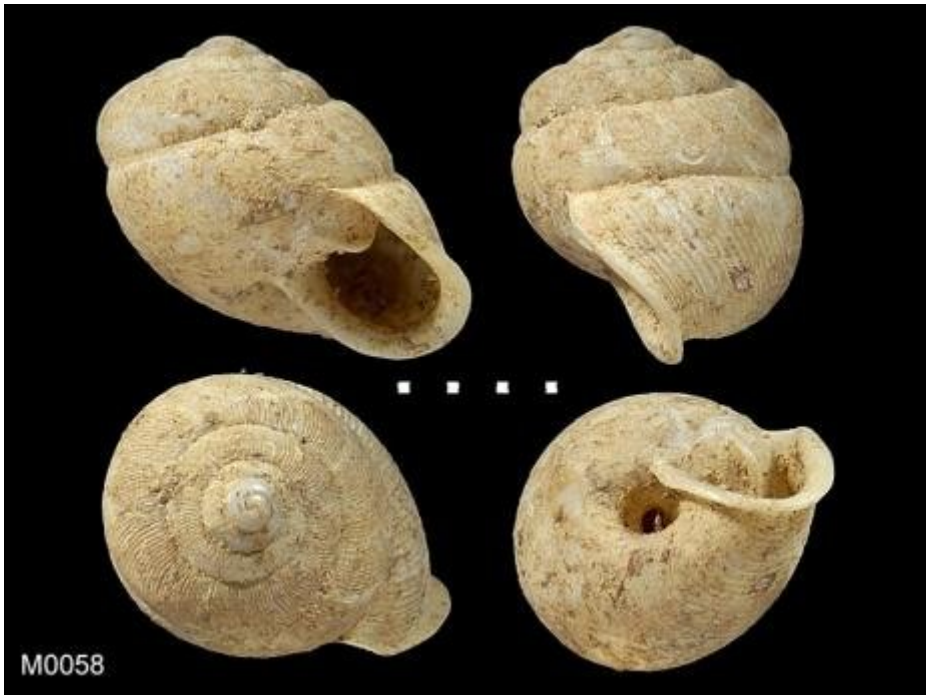


Figure 1 : Shell morphology of *Haploptychius* sp. (Pictures by http://malaypeninsularsnail.lifedesks.org/

Figure 2 : Shell morphology of *Haploptychius petitii* (Gould, 1844)

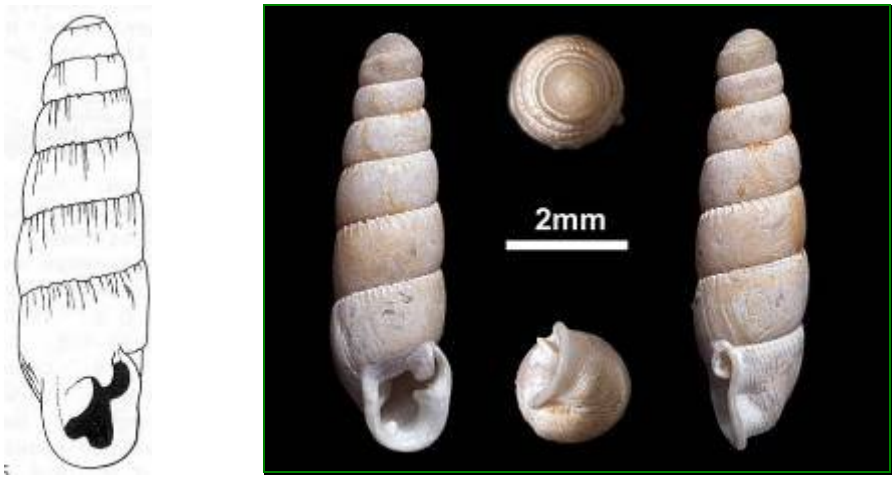
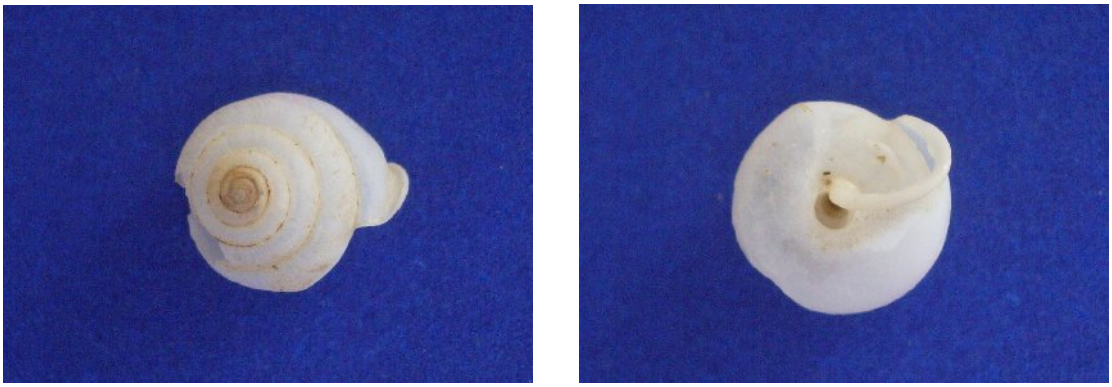


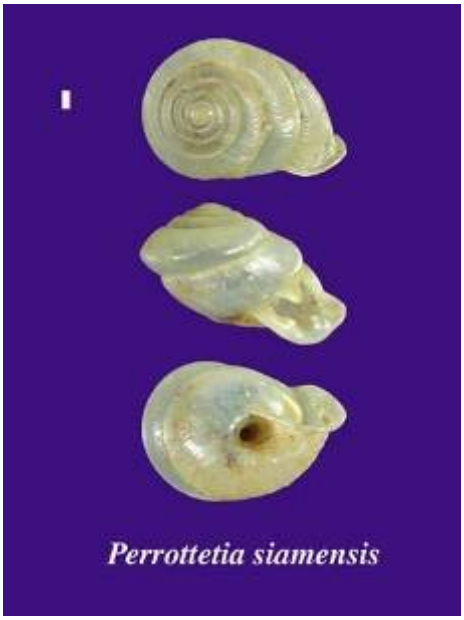
Figure 3 : Shell morphology of *G. bicolor* (Hutton,1834)
(Pictures by http://www.nhm.ac.uk)

Figure 4 : Living specimen of the two-toned snail; *Gulella bicolo*r (Hutton,1834)



Bar Scale = 1 C.M.

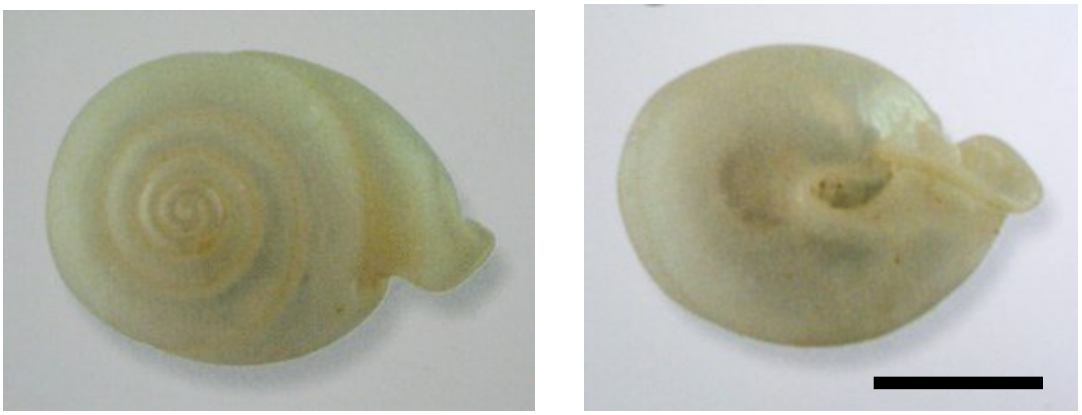
Figure 5 : Shell morphology of *Oophana* sp.



Bar Scale = 1 C.M.

Figure 6 : Shell morphology of *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862)

Figure 7 : Living specimens of *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862)



Bar Scale = 5 M.M.

Figure 8 : Shell morphology of *Discartemon* sp.

Figure 9. : Study areas, Kanchanaburi province : 1. Sai Yok Noi Waterfall 2. Erawan National Park 3. Panom Thuan district 4. Lawa Cave

Figure 10. : Study areas, Nakornratchasima province: 1. Khao Yai National Park 2. Pak Chong district 3. Wang Nam Khiao district

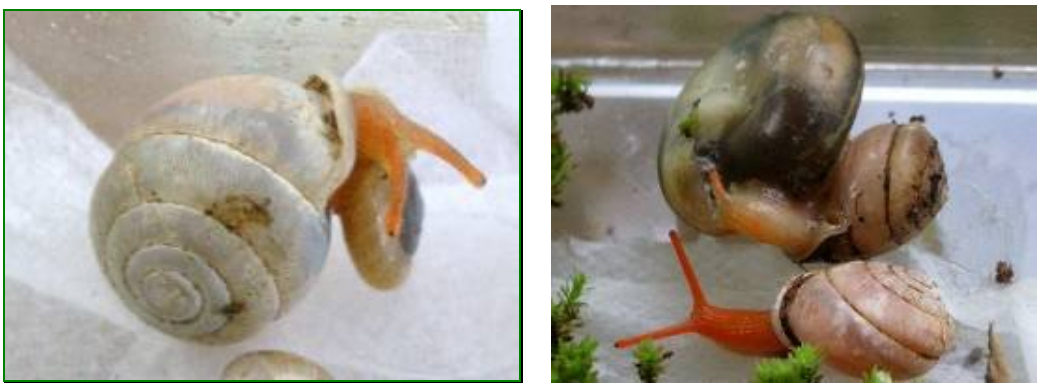


Figure 11 : The predatory snail*; Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862) feeding on *Cryptozona* sp.

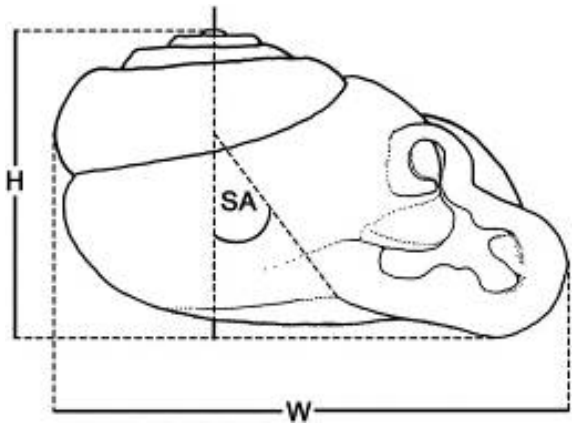


Figure 12: Schematic diagram illustrating methods for measuring specimens: H = shell height, SA = shell angle, W = shell width.

Table 1 : Sample collection sites and sample sizes of predatory snail : Family Steptaxidae

		Abbreviation	Sample size (N)
Gulella bicolor	Kanchanaburi	GbKBW	32
	Chonburi	GbCBE	8
	Samuthsakorn	GbSSaC	10
	Nakhonpathom	GbNPC	3
Perrottetia	Nakornratchasima	PsNRNE	42
	Nakhonnavok	PsNNC	18
Haploptychius	Kanchanaburi	HpKBW	6
Oophana sp.	Kanchanaburi	O-KBW	2
Haploptychius sp.	Chiangmai	H-CMN	3
Discartemon sp.	Phangnga	D-PGS	5
	Songkhla	D-SKS	5
	Chumporn	D-CPS	37
	Suratthani	D-SRS	23

Abbreviations: Gb, *Gulella bicolor* ; Ps, *Perrottetia siamensis* ; Hp, *Haploptychius petitii* ; O -, *Oophana* sp. ; H-, *Haploptychius sp.*; D-, *Discartemon* sp.
N = north, NE= northeast, C = Central region, W= west, S = South

Table 2: Density of snails and egg batches, clutch size and characteristics of egg-batch dispersion in 5 treatments of *P. Siamensis* (Pfeiffer,1862)

Treatment	No. of adult per m^2	No. of egg per m^2	Clutch size	Distance to nearest neighbour batch	Proportion of egg deposited within a nearest	
	x±SE	x±SE	x±SE	x (N)	neighbour distance of	
					≤5cm	≤ 10 cm
1	5.1 ±0.8	12.0±0.1	22.6±0.9	11. (6)	0.29	0.45
2	2.6±1.1	6.5±0.4	16.0±0.3	10. (3)	0.39	0.58
3	4.8±1.3	3.8±0.2	9.2±0.5	14. (7)	0.21	0.43
4	1.3±1.2	5.2±0.5	19.2±0.5	11. (6)	0.2	0.15
5	5.5± 1.6	14.3±0.2	20.3±0.5	14. (7)	0.2	-

Table 3 : Lists of predatory land snails, **Family** Streptaxidae which were collected from Thailand including habitat and status. (2010-2013)

Taxonomic Classification	Habitat	Status
Class Gastropoda		
(gastropods, slugs, and snails)		
Subclass Pulmonata		
Order Stylommatophora		
Superfamily : Streptaxoidae		
Family Streptaxidae		
☆ **Genus *Gulella (Huttonella)***		
Species *Gulella bicolor*		
(Hutton,1834)	Ground	Introduced
☆ **Genus *Perrottetia***		
Species *Perrottetia siamensis*		
(Pfeiffer,1862)	Ground	Indigenous
☆ **Genus *Haploptychius***		
Species *Haploptychius petitii*		
(Gould, 1844)	Ground	Indigenous
Species *Haploptychius sp.*	Ground	Indigenous
☆ **Genus *Oophana***		
Species *Oophana* sp.	Ground	Indigenous
☆ **Genus *Discartemon***		
Species *Discartemon* sp.	Ground	Indigenous

การทดลองที่ 4.1.5 การสำรวจปรสิตในหอยวงศ์ Ariophantidae

ผลการทดลอง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Ariophantidae

ได้ดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกในวงศ์ Ariophantidae ในพื้นที่เกษตรกรรม พื้นที่เขตป่า และเขตบ้านเรือนในพื้นที่ภาคต่างๆ นำมาศึกษาลักษณะและจำแนกชนิดตามระบบอนุกรมวิธานของหอยตามเอกสารของ Abbott (1989), Hemmen and Hemmen (2001)และ Panha (1996) พบหอยทากบกจำนวน 4 ชนิด ดังนี้

1.*Cryptozonasiamensis* (Pfeiffer, 1856);หอยทากสยาม, หอยดักดาน

ลักษณะสำคัญ: เปลือกหอยมีลักษณะเป็นโดมเตี้ยหรือค่อนข้างแบนส่วนยอดนูนเล็กน้อย มีวงเปลือก (whorl) 8–12 ชั้น ความกว้างเปลือก (shell width; SW) เฉลี่ย 27.28 มิลลิเมตร (20.38 - 31.34 มิลลิเมตร) ความสูงของเปลือก(shell height; SH)เฉลี่ย 12.54 มิลลิเมตร (5.98 – 16.09 มิลลิเมตร) เปลือกด้านบนสีน้ำตาล ผิวเปลือกมีสันบางๆ เล็ก ลักษณะเป็นริ้วตาข่าย เปลือกด้านล่างสีขาวนวลผิวเรียบ โดยมีเส้นสีน้ำตาลแดงคั่นกลางระหว่างเปลือกด้านบนและด้านล่าง ลำตัวหอยสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม บางครั้งเป็นสีเทาดำ (Figure 1.)

แหล่งที่พบ : พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ศรีสะเกษ อุบลราชธานี นครนายก ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี ตาก และชุมพร โดยพบได้ทั่วไปตามพื้นดินที่ชื้น ตามซากเน่าเปื่อย บนใบไม้หรือยอดอ่อนทั้งในเขตบ้านเรือน พื้นที่เกษตรกรรม และเขตป่าพบมากในช่วงฤดูฝน หรือหลังฝนตก ช่วงอากาศร้อนมักหลบอยู่ตามโพรงไม้ ใต้ซอกหินที่ชื้น โดยเก็บตัวอย่างได้ 51 ตัว

2.*Macrochlamys* spp. ;หอยขัดเปลือก

ลักษณะสำคัญ : เปลือกบางค่อนข้างใสและโปร่งแสง สีน้ำตาลอ่อน ผิวเปลือกมันวาว เปลือกรูปร่างกลมและค่อนข้างแบน ส่วนยอดนูนเล็กน้อย หอยในกลุ่มนี้มีเนื้อเยื่อบางๆ ของ mantle ส่วนปลายยื่นออกมาสร้างเมือก เรียกว่า mantle flap ใช้ขัดถูเปลือกให้เปลือกมันวาวเสมอ ความกว้างเปลือกเฉลี่ย 15.32 มิลลิเมตร (11.08 - 18.34 มิลลิเมตร) ความสูงของเปลือกเฉลี่ย 6.59 มิลลิเมตร (4.83 – 8.09 มิลลิเมตร)(Figure 2.)

แหล่งที่พบ : จังหวัดตาก โดยพบบริเวณน้ำตก และบริเวณใกล้เคียง พื้นดินชื้นแฉะ โคนต้นไม้ จำนวนหอยทากที่เก็บตัวอย่าง 8 ตัว

3. *Megausteniasiamensis* (Haines, 1858) ;หอยห่อเปลือกใหญ่สยาม

ลักษณะสำคัญ : เป็นหอยทากลดเปลือก ลักษณะเปลือกบางและใส ผิวเปลือกเรียบ ปากเปลือกกว้าง มีวงเปลือก 2 – 3 ชั้น ลำตัวสีน้ำตาลเข้มหรือเทาเข้ม ผิวหนังเป็นตุ่มขรุขระ มีจุดสีดำกระจายบนผิวหนัง ผิวหนังบางส่วนจะยื่นออกเป็นเนื้อเยื่อบางๆ ปกคลุมเปลือก เรียกว่า mantle lapped (Figure 3.) แต่เมื่อหอยถูกรบกวนเนื้อเยื่อส่วนนี้สามารถหดเข้าในเปลือกได้

แหล่งที่พบ : จังหวัดตาก พบมากช่วงฤดูฝน โดยพบอาศัยอยู่ที่โคนต้นไม้ บนใบหรือยอดอ่อนของต้นไม้ บริเวณน้ำตก และรอบๆ ที่พักอาศัยที่ชื้นแฉะ จำนวนหอยทากที่เก็บตัวอย่าง 32 ตัว

Figure. 1*Cryptozona siamensis*(Pfeiffer, 1856)

Figure 2.*Macrochlamys* spp.

Figure 3.*Megausteniasiamensis* (Haines, 1858)

4.*Sarikaresplendens* (Philippi, 1843) ;หอยขัดเปลือกธรรมดา

ลักษณะสำคัญ : ลักษณะเปลือกค่อนข้างแบน เปลือกบางใส สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม ผิวเปลือกเรียบ ร่องระหว่างวงเปลือกตื้น ขอบเปลือกมน ความกว้างเปลือกเฉลี่ย 18.28 มิลลิเมตร (16.87-19.77 มิลลิเมตร) ความสูงของเปลือกเฉลี่ย 9.22 มิลลิเมตร (8.21-10.20 มิลลิเมตร) (Figure 4)

แหล่งที่พบ : จังหวัดเชียงราย ตาก นครนายก และกรุงเทพฯ โดยพบได้ทั่วไปตามพื้นดินที่ชื้น โคนต้นไม้ บนยอดอ่อนต้นไม้ ทั้งในเขตบ้านเรือนที่ติดกับป่า และเขตป่าจำนวนหอยทากที่เก็บตัวอย่าง 17 ตัว

Figure 4.*Sarikaresplendens* (Philippi, 1843)

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยทากบกในวงศ์ Ariophantidaeสามารถจำแนกได้ 4 สกุล (genus) 4 ชนิด (species) โดยพบว่า หอยทากสยาม *Cryptozonasiamensis* (Pfeiffer, 1856)สามารถพบได้ทุกจังหวัดที่ออกเก็บตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ จิรศักดิ์ และสมศักดิ์ (2551) ว่าสามารถพบแพร่กระจายทั่วประเทศไทยแม้ในพื้นที่ราบลุ่มภาคกลาง มักอาศัยอยู่ตามพื้น ซากพืชเน่าเปื่อย นอกจากนี้ยังพบเป็นสัตว์ศัตรูพืชในสวนผลไม้ และมีการกัดทำลายผลมะละกอสุกในสวนมะละกอ กล้าไม้ ดอกไม้ประดับในเรือนเพาะชำ กัดตาดอกและใบกล้วยไม้ (ชมพูนุท, 2545)และพบบริเวณที่ไม่ไกลจากถนน แหล่งท่องเที่ยว ชุมชน และพื้นที่เกษตรกรรมที่มีกิจกรรมของมนุษย์ (ชนิดาพร และศักดิ์บวร, 2553; ศิริชัย และคณะ, 2553) ซึ่งไข่ หรือตัวอ่อน หรือตัวเต็มวัยที่จำศีลอาจติดไปกับกระถางต้นไม้ประดับ กล้าไม้ ผลผลิตทางการเกษตร เป็นต้น ทำให้สามารถแพร่กระจายพันธุ์ไปในแหล่งที่มีกิจกรรมของมนุษย์ได้ (ปฏิพล และคณะ, 2556) ในขณะที่หอยขัดเปลือก*Macrochlamys* spp. หอยห่อเปลือกใหญ่สยาม *Megausteniasiamensis* (Haines, 1858) พบที่ภาคเหนือ โดยเฉพาะบริเวณน้ำตก และบริเวณใกล้เคียงที่ชื้นแฉะ และพบมากช่วงหลังฝนตกและจากการวิจัยครั้งนี้พบหอยทากบกที่เป็นศัตรูพืช 2 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยาม *Cryptozonasiamensis* และหอยขัดเปลือกธรรมดา *Sarikaresplendens* (Philippi, 1843) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของชมพูนุท (2537) ได้สำรวจหอยทากและทากที่เป็นศัตรูพืชในประเทศไทย ได้แก่ หอยทากยักษ์อาฟริกาGiant African Snail;*Achatinafulica*Bowdich (1822), หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopeaswalkeri* (Benson), หอยเจดีย์เล็ก*Lamellaxisgracilis*(Hutton), หอยสาริกา*Sarika* spp., หอยซัคซิเนียAmber Snail; *Succinea* spp., หอยทากสยาม*Cryptozonasiamensis*, หอยเลขหนึ่ง *Ovachlamysfulgens* (Gauld), ทาก *Parmarion* sp. และทากฟ้า*Semperulasiamensis*

ปรสิตที่พบในหอยทากบกวงศ์ Ariophantidae

จากการตรวจหาปรสิตจากตัวอย่างหอยทากบกด้วยวิธี digestion technique พบปรสิตในกลุ่มหอยทากสยาม *Cryptozonasiamensis* (Pfeiffer, 1856) เท่านั้น (Table 1) คือ *Rhabditis* spp. ปรสิตที่พบเป็นกลุ่มของหนอนตัวกลม (round – worm, nematodes) โดยพบได้จากตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดชุมพร และสุพรรณบุรี

ปรสิตที่พบสามารถจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ ดังนี้

Kingdom Animalia
Phylum Nematoda
Class Secernentea
Order Rhabditida
Family Rhabditidae
Genus Rhabditis

ปรสิตที่พบมีรูปร่างทรงกระบอกเรียวยาว ความยาวตัวประมาณ 0.28 มิลลิเมตร (0.24-0.34 มิลลิเมตร) ความกว้างตัวประมาณ 0.14 มิลลิเมตร (0.12-0.17 มิลลิเมตร) (Figure 5.) มีชั้นคิวติเคิล หุ้มลำตัว ส่วนหัวเรียวและมน มีริมฝีปาก (lips) นูนขึ้นมา6 อัน ไม่มี stylet ช่องปาก (stoma) มีลักษณะเป็นท่อทรงกระบอก เปิดออกสู่หลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งเป็นท่อยาวแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ corpus isthmus และbulbรูเปิดขับถ่ายของเสีย (excretory pore) อยู่ด้านข้างลำตัวที่ตำแหน่งประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวตัว รูเปิดสืบพันธุ์เพศเมีย (vulva) เปิดออกที่ประมาณตำแหน่งที่ 2 ใน 3 ของความยาวตัว ด้านท้ายลำตัวมีรูเปิดทวารหนัก (anus) ปลายหางเรียวแหลม (Figure 6.) มีความยาวประมาณ 0.027 มิลลิเมตร (0.024-0.029 มิลลิเมตร)

Rhabditis spp.ในหอยทากบกพบเฉพาะตัวอ่อน เนื่องจากระบบสืบพันธุ์ยังไม่พัฒนาหรือพัฒนาไม่เต็มที่ส่วนตัวเต็มวัยพบหากินอิสระในพื้นดินที่ชื้นแฉะ (free-livingnematode) ซึ่งสอดคล้องกับGrewal *et,al.* (2003)ที่ศึกษาหนอนตัวกลมในหอยทากบกโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มของหอยทากบกที่เป็นโฮสต์กึ่งกลาง (intermediate host) ให้ตัวอ่อนของหนอนตัวกลมอาศัยอยู่และทำให้โฮสต์ตาย ได้แก่ หนอนตัวกลมในวงศ์ Strongylida, OxyuridaและRhabditida (โดยเฉพาะ *Angiostrongylus*spp. ที่ก่อโรคในคน) กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มของหอยทากบกที่เป็นโฮสต์สุดท้าย (definitive host, final host) ซึ่งโดยปกติจะมีตัวเต็มวัยของหนอนตัวกลมอาศัยอยู่ ยกเว้นในหนอนตัวกลม *Rhabditis* spp.ซึ่งพบระยะตัวอ่อน (juvenile nematode stage) อาศัยอยู่ใน body cavity และ foot muscle ซึ่งอาจไม่เป็นอันตรายต่อโฮสต์หรืออาจทำให้โฮสต์ตาย ในขณะที่ตัวเต็มวัยหากินอิสระในสิ่งแวดล้อม (free-living nematodes) และจากการศึกษาของ วิยะดา (2556) พบตัวอ่อนของ *Rhabditis* spp.ในทางเดินอาหารของหอยทากยักษ์อาฟริกัน มีลักษณะลำตัวเรียวยาว มีริมฝีปาก 6 อัน หลอดอาหารแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ procorpus metacarpus และ isthmusและมีปลายหางเรียวแหลมซึ่งมีลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า *Rhabditis* spp. สามารถอาศัยอยู่ในหอยทากบกชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ หอยเดื่อ *Hemiplectadistincta*, *Pamarion* sp., Arion spp., *Succineaoblonga*, *Achatinaachitina*และ *Achatinafulica* (วิยะดา, 2544; Grewal and Grewal,2003)

Figure 5. Nematode of *Cryptozonasiamensis*(Pfeiffer, 1856)

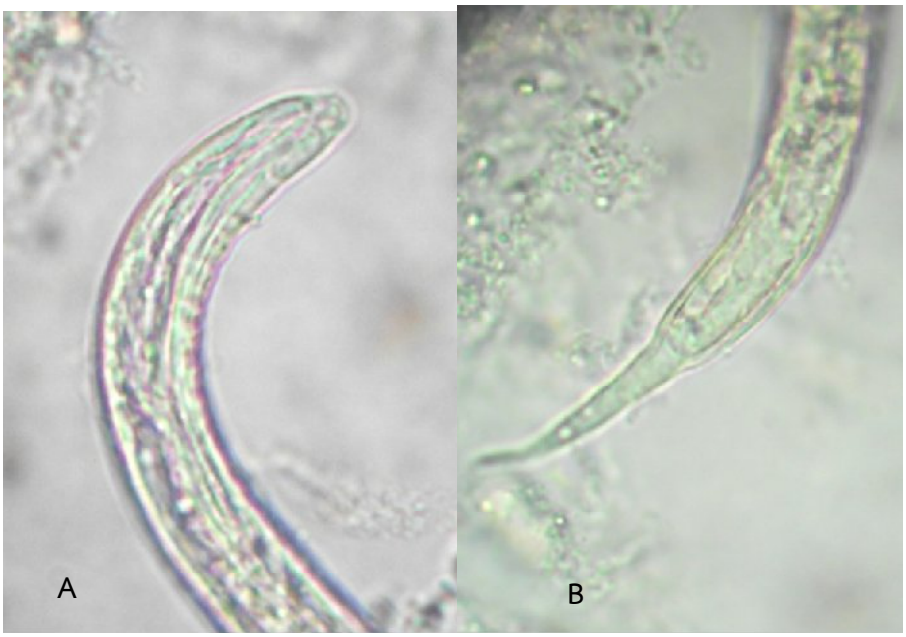


Figure 6. Anterior region (A.), posterior region (B)

ในประเทศไทยมีการศึกษาด้านการนำหนอนตัวกลมมาใช้ในการป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืช โดย Seehabut (2005) ศึกษาเกี่ยวกับปรสิตในหอยทากบก พบหนอนตัวกลมชนิด *Rhabditis* spp. ในทางเดินอาหารของหอยทากยักษ์อาฟริกา, *Achatinafulica*Bowdich (1822) และพบว่าปรสิตชนิดนี้ไม่เป็นอันตรายต่อหอยทากยักษ์ และสามารถพบได้ในหอยทากบกชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น หอยเดื่อ, *Hemiplectadistincta* ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าหอยทากยักษ์อาฟริกาอาจเป็นสัตว์อาศัยโดยบังเอิญ (accidental host) และเนื่องจาก *Rhabditis* spp. เป็นปรสิตที่พบในลำไส้ของหอยเดื่อ ซึ่งสามารถยับยั้งการพัฒนาของไข่หอยเชอรี่ได้ จึงทดลองเลี้ยงหอยเดื่อกับหอยเชอรี่ถังเลี้ยงเดียวกัน เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าหอยเชอรี่ไม่วางไข่เลย และมีการทดลองในสภาพธรรมชาติ บริเวณแหล่งน้ำที่หอยเชอรี่อยู่กันอย่างหนาแน่น ให้เหยื่อลอยน้ำที่มี *Rhabditis* spp. เป็นเวลา 10 วัน พบว่าไข่หอยเชอรี่มีอัตราการฟัก 40–50% ระยะการฟักตัวใช้เวลานานขึ้นและไข่บางกลุ่มไม่ฟักตัว โดยพบว่ามีของเหลวเป็นวุ้นอยู่ภายในไม่มีตัวอ่อน นอกจากนี้ยังพบว่าปรสิตชนิดนี้ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาไปสู่การป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป

Table 1. Nematodes parasitic in terrestrial gastropods (Family Ariophantidae)

Host species	Number collected	Parasite species recovered
Cryptozonasiamensis (Pfeiffer, 1858)	51	*Rhabditis* spp.
Macrochlamys spp.	8	-
Megausteniasiamensis (Haines, 1858)	32	-
Sarikaresplendens (Philippi, 1843)	17	-

กิจกรรมย่อยที่ 4.2 การควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี

การทดลองที่ 4.2.1ศักยภาพของฝอยทองในการควบคุมขี้ไก่ย่าน

ผลการทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1 ทดลองใช้ฝอยทองควบคุมขี้ไก่ย่าน

จากการใช้ฝอยทองชนิดมีเมล็ด (Chinese dodder); *Cuscuta chinensis* Lamk. และฝอยทองไม่มีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านอายุ 80 วัน ซึ่งมีลักษณะความหนาแน่นใกล้เคียงสภาพธรรมชาติ โดยใช้กิ่งของพืชอาศัยที่มีฝอยทองเกาะอยู่ จำนวน 1, 2, 3 และ 4 กิ่ง พบว่าหลังปล่อยฝอยทอง การใช้กิ่งพืชอาศัยที่มีฝอยทองติดอยู่ปล่อยฝอยทองฝอยทองที่ติดอยู่กิ่งพืชอาศัยมีการปรับตัวให้เข้ากับต้นขี้ไก่ย่านได้ช้า ต้องมีการปล่อยซ่อม 3 ครั้ง เพื่อให้ได้จำนวนต้นฝอยทองตรงตามกรรมวิธีที่กำหนด กรรมวิธีที่ใช้ฝอยทองชนิดมีเมล็ดปล่อย 4 กิ่ง จากการปล่อยซ่อม 3 ครั้งฝอยทองพัฒนาได้ไม่ครบตามกรรมวิธี จึงต้องตัดกรรมวิธีนี้ออก

ตารางที่ 1 น้ำหนักแห้งต้นขี้ไก่ย่านและฝอยทองหลังการเบียนต้นขี้ไก่ย่านอายุ 80 วัน นาน 120 วัน

กรรมวิธี		น้ำหนักแห้งต้นฝอยทอง (กรัม)		น้ำหนักแห้งต้นขี้ไก่ย่าน (กรัม)	
ชนิดฝอยทอง	จำนวนฝอยทอง	มีชีวิต	ตาย	มีชีวิต	ตาย
ฝอยทองมีเมล็ด	1 กิ่ง	0.67 ab	0.77 b	125.0 a	116.5 a
ฝอยทองมีเมล็ด	2 กิ่ง	0.83 ab	0.61 ab	198.6 ab	143.8 a
ฝอยทองมีเมล็ด	3 กิ่ง	2.56 ab	1.67 a	76.4 a	70.8 a
ฝอยทองไม่มีเมล็ด	1 กิ่ง	2.56 ab	0.62 ab	133.1 a	65.2 a
ฝอยทองไม่มีเมล็ด	2 กิ่ง	3.1 ab	0.52 b	491.3 b	105.2 a
ฝอยทองไม่มีเมล็ด	3 กิ่ง	5.98 a	0.34 b	249.9 ab	194.0 a
ฝอยทองไม่มีเมล็ด	4 กิ่ง	1.32 ab	1.81 a	267.1 ab	159.3 a
ไม่มีฝอยทอง		0 b	0 b	375.6 ab	152.9 a
C.V. (%)		118.8	119.4	74.8	66.2

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%โดยวิธี DMRT

หลังจากฝอยทองสร้าง haustoria เกาะติดกับต้นขี้ไก่ย่านแล้ว ส่วนยอดของฝอยทองพยายามเจริญออกสู่ภายนอกทรงพุ่มเพื่อปกคลุมใบขี้ไก่ย่าน ต้นและใบขี้ไก่ย่านจะถูกดูดกินน้ำเลี้ยงค่อยๆแห้งไป เมื่อขี้ไก่ย่านบริเวณที่ถูกฝอยทองเกาะแห้งไป ต้นฝอยทองก็จะแห้งตามไปด้วย ส่วนลำต้นขี้ไก่ย่านที่ยังสดจะแตกใบใหม่ออกมา และส่วนของต้นฝอยทองที่เหลือเกาะลำต้นที่ยังสดอยู่แม้เพียงเล็กน้อย ก็จะเริ่มแตกยอดใหม่ออกมา และเริ่มเกาะดูดกินน้ำในต้นขี้ไก่ย่านต่อไป เป็นวงจรต่อเนื่องจนกว่า ขี้ไก่ย่านจะแห้งตายไป

จากการเฝ้าติดตามอย่างต่อเนื่องพบว่าจำนวนกิ่งฝอยทองที่เริ่มปล่อยยิ่งมาก ก็ยิ่งช่วยให้ฝอยทองแผ่ปกคลุมพื้นที่ได้เร็ว ทำให้ต้นขี้ไก่ย่าน ตายเร็วกว่าการปล่อยฝอยทองน้อย และการงอกใหม่อย่างต่อเนื่องจึงทำให้สามารถรักษาสมดุลย์ของวงจรการเบียนได้

ที่ 120 วันหลังการปล่อยฝอยทอง ผลของการควบคุมโดยชีววิธีดูได้จากน้ำหนักแห้งของต้นขี้ไก่ย่านและฝอยทองที่ยังมีชีวิต พบว่ากรรมวิธีที่ใช้ฝอยทองชนิดมีเมล็ดเบียน ต้นขี้ไก่ย่านเหลือน้อยกว่าการใช้ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดเบียน สอดคล้องกับการทดลองในสภาพธรรมชาติ ซึ่งขี้ไก่ย่านยุบตัวช้า และเหลือมีชีวิตรอดมาก แต่ฝอยทองก็ยังเหลืออยู่ในธรรมชาติ ไม่ถึงกับสามารถกำจัดให้หมดไปได้ หลังจากที่ฝอยทองเบียนจนต้นขี้ไก่ย่านตายแล้ว ฝอยทองยังมีการแตกใหม่ จากส่วนของต้นขี้ไก่ย่านที่ยังมีชีวิต ทำให้สามารถรักษาสภาพการเบียนได้อย่างต่อเนื่อง ในสภาพธรรมชาติจึงยังพบฝอยทองต้นมีชีวิต และเนื่องจากการใช้กิ่งพืชอาศัยที่มีฝอยทองติดอยู่มีความแปรปรวนต่อการมีชีวิตรอดของฝอยทอง จึงพบว่าจำนวนกิ่งที่ปล่อยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างกับการไม่ปล่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองย่อยที่ 2 ทดลองใช้ฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไย (ปี 2555)

จากการปล่อยฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไย ติดตามดูแลการมีชีวิตรอดของฝอยทองบนต้นขี้ไก่ย่าน กำจัดวัชพืชชนิดอื่นที่ขึ้นรบกวน ดูแลให้ต้นขี้ไก่ย่านและฝอยทองเลี้ยพันอยู่ในกระถางของตนเอง พบว่าฝอยทองชนิดมีเมล็ดเจริญเติบโตปกคลุมต้นขี้ไก่ย่านเบียนเร็วกว่าฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ด พบว่าในช่วง 3 เดือนหลังปล่อยฝอยทอง ฝอยทองชนิดมีเมล็ดเจริญเติบโตเต็มที่ เบียนต้นขี้ไก่ย่านได้ 2 รอบ โดยไม่เป็นอันตรายต่อต้นและใบลำไย ขณะที่ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดเจริญเติบโตปกคลุมต้นขี้ไก่ย่านช้ากว่าเบียนต้นขี้ไก่ย่านได้รอบเดียว การเจริญเติบโตของต้นลำไยไม่แตกต่างกันระหว่างฝอยทอง 2 ชนิด แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับต้นลำไยที่ไม่ถูกเบียนซึ่งต้นโตที่สุด ส่วนต้นลำไยที่ถูกปกคลุมด้วยต้นขี้ไก่ย่านและไม่ได้ใช้ฝอยทองเบียนมีการเจริญเติบโตน้อยที่สุด และการใช้ฝอยทองเบียนในสภาพที่มีต้นขี้ไก่ย่านไม่หนาแน่น (ต้นขี้ไก่ย่าน 2 ต้น) (ตารางที่ 2) พบว่าต้นขี้ไก่ย่านตายทั่วถึงกว่าสภาพที่มีต้นขี้ไก่ย่านหนาแน่น (ต้นขี้ไก่ย่าน 4 ต้น) (ตารางที่ 3) ดังนั้นในสภาพที่มีต้นขี้ไก่ย่านขึ้นหนาแน่นจึงควรเพิ่มจำนวนฝอยทองที่ใช้เบียน

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของต้นลำไยหลังปล่อยฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านในสภาพที่ต้นขี้ไก่ย่านขึ้นปกคลุมไม่หนาแน่น (ใช้ต้นขี้ไก่ย่าน 2 ต้น/ต้นลำไย 1 ต้น และปล่อยฝอยทอง 2 ยอด/ต้นลำไย 1 ต้น)

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของต้นลำไย (หลังปล่อยฝอยทองเบียน)				
	ความสูงต้น (เซ็นติเมตร)			3 เดือน	
	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	จำนวนก้าน (ก้าน/ต้น)	น้ำหนักต้น (กรัม/ต้น)
ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นคลุมต้นลำไย	78.2 a	82.3 a	103.3 a	20.2 a	130.5 a
ฝอยทองชนิดมีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นคลุมต้นลำไย	73.5 a	81.2 a	104.8 a	21.7 a	133.7 a
ปล่อยต้นขี้ไก่ย่านขึ้นคลุมต้นลำไย	60.5 b	65.2 b	85.5 b	14.0 b	87.7 b
ต้นลำไยไม่มีต้นขี้ไก่ย่านขึ้นคลุม	76.2 a	80.3 a	103.8 a	23.3 a	140.7 a
C.V. (%)	14.7	13.0	10.3	16.7	25.2

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%โดยวิธี DMRT

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของต้นลำไยหลังปล่อยฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านในสภาพที่ต้นขี้ไก่ย่านขึ้นปกคลุมหนาแน่น (ใช้ต้นขี้ไก่ย่าน 4 ต้น/ต้นลำไย 1 ต้น และปล่อยฝอยทอง 2 ยอด/ต้นลำไย 1 ต้น)

กรรมวิธี	การเจริญเติบโตของต้นลำไย (หลังปล่อยฝอยทองเบียน)				
	ความสูงต้น (เซ็นติเมตร)			3 เดือน	
	1 เดือน	2 เดือน	3 เดือน	จำนวนก้าน (ก้าน/ต้น)	น้ำหนักต้น (กรัม/ต้น)
ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นคลุมต้นลำไย	59.0 c	62.9 c	84.8 b	14.9 c	92.6 b
ฝอยทองชนิดมีเมล็ดเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นคลุมต้นลำไย	66.1 b	74.3 b	92.7 b	19.6 b	106.3 b
ปล่อยต้นขี้ไก่ย่านขึ้นคลุมต้นลำไย	60.3 bc	64.9 c	86.7 b	16.1 c	85.6 b
ต้นลำไยไม่มีต้นขี้ไก่ย่านขึ้นคลุม	84.6 a	87.7 a	110.6 a	23.3 a	159.9 a
C.V. (%)	8.6	10.1	9.0	13.4	19.1

ตัวเลขในคอลัมน์เดียวกันตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%โดยวิธี DMRT

ศักยภาพของฝอยทองในการควบคุมขี้ไก่ย่าน		
ต้น ใบและดอกขี้ไก่ย่าน	ฝอยทองชนิดมีเมล็ดที่ จ. เชียงใหม่	ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ดที่จ. นครปฐม
ยอดฝอยทองที่นำไปปล่อย	ทดลองใช้ฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่าน	ขี้ไก่ย่านที่ถูกเบียนอาการใบซีดขาว
ฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไย	ฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไย	ฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านโดยไม่เป็นอันตรายต่อต้นลำไย
ต้นลำไยเจริญเติบโตดีหลังลขขี้ไก่ย่านถูกฝอยทองเบียนตายไปแล้ว	ต้นขี้ไก่ย่านที่ยังเหลือรอดจะมีฝอยทองแตกขึ้นมาเบียนซ้ำ	ฝอยทองเบียนต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นกล้วย

การทดลองที่ 4.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของถั่วคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียมต่อการควบคุมหญ้าคา

ผลการทดลอง

<u>การเจริญเติบโตของถั่ว</u> <u>*Calopogonium caeruleum*</u>

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *Calopogonium caeruleum* ในแปลงที่มีหญ้าคา พบว่า ที่ 15 วันหลังการปลูก การเจริญเติบโตของถั่ว *C. caeruleum* อยู่ในระยะการตั้งตัวและมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ จนถึงระยะ 30 วันหลังปลูก จะพบว่าถั่ว *C. caeruleum* เริ่มมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น ซึ่งเห็นได้จากการทอดยอดและแตกกิ่งใหม่ ในขณะที่หญ้าคามีการเจริญเติบโตเป็นปกติ และในระยะ 1 -2 เดือนหลังการปลูก การเจริญเติบโตของถั่ว *C. caeruleum* มีความสามารถในการแข่งขันกับหญ้าคาน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากการเจริญเติบโตของถั่ว *C. caeruleum* ยังไม่ครอบคลุมพื้นที่ได้เพียงพอ ซึ่งการเจริญเติบโตในระยะแรกจะมีลักษณะเลื้อยไปตามผิวดินไม่ยึดเกาะกับต้นพืชที่อยู่ในแนวตั้ง เมื่อทอดยอดไปพบวัชพืชใดจะเบนเลื้อยออกไปจนกว่าต้นถั่วจะเจริญเต็มพื้นที่ (สุจินต์ และคณะ 2526) และเริ่มมีการคลุมวัชพืชได้ตั้งแต่ 3 เดือน ซึ่งการเจริญเติบโตดังกล่าวเป็นไปอย่างรวดเร็ว โดยในทุกกรรมวิธีการปลูกที่จำนวนต้น 1, 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนกิ่งเฉลี่ยระหว่าง 5-8.2 กิ่งต่อต้น และความสูง(ความยาว)เฉลี่ยระหว่าง 102.9-135.9 เซนติเมตร (ตารางที่ 1)

<u>ประสิทธิภาพการควบคุมหญ้าคาด้วยสายตา</u>

การประเมินประสิทธิภาพการควบคุมหญ้าคาของถั่ว *C. caeruleum* พบว่า ที่ระยะ 30 วันหลังปลูก ถั่ว *C. caeruleum* ที่ 1, 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร เริ่มมีการเจริญเติบโตและตั้งตัวได้ แต่มีการแข่งขันกับหญ้าคาน้อยมาก ทำให้การประเมินประสิทธิภาพในการควบคุมหญ้าคาได้น้อย(ภาพที่ 1) แต่ที่ระยะ 60 วันหลังปลูก พบว่าถั่ว *C. caeruleum* มีประสิทธิภาพในการควบคุมหญ้าได้มากขึ้น ประเมินได้คะแนน 5, 6, 7 และ 7 คะแนน ตามลำดับ แต่ที่ระยะ 90 วันหลังปลูก ถั่ว *C. caeruleum* มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีการแข่งขันกับหญ้าคาได้ดี ประเมินได้คะแนน 7, 8.0, 8.5 และ 9.5 คะแนน ตามลำดับ และที่ระยะ 120 วันหลังปลูก ในกรรมวิธีที่ปลูกถั่ว *C. caeruleum* 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร สามารถควบคุมหญ้าได้ดีมาก โดยไม่พบว่ามีหญ้าคางอกขึ้นมา ประเมินได้คะแนน 10 คะแนน (ตารางที่ 2)

<u>เปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่ของถั่ว *C. caeruleum*</u>

การประเมินการคลุมพื้นที่ พบว่า ที่ระยะ 4 เดือนหลังปลูก ถั่ว *C. caeruleum* มีการเจริญเติบโตเร็วขึ้นมาก มีเปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในกรรมวิธีปลูกถั่ว 1 และ 2 ต้นต่อตารางเมตร ในขณะที่กรรมวิธีปลูกถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร มีเปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ถั่ว *C. caeruleum* สามารถเจริญเติบโตคลุมพื้นที่ได้ทั้งหมดในระยะเวลา 5 เดือน โดยมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น ซึ่งมีจำนวนกิ่งเฉลี่ยมากกว่า 10 กิ่งต่อต้น และมีความยาวเฉลี่ยมากกว่า 300 เซนติเมตร สังเกตได้จากช่วงแรกถั่ว *C. caeruleum* จะเลื้อยตามพื้นดิน เมื่อมีการเจริญเติบโตเต็มที่จะเกาะต้นหญ้าคาให้ล้มลง จนไม่สามารถมองเห็นต้นหญ้าคาได้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และทำให้หญ้าคาตาย ซึ่งเห็นได้จากกรรมวิธีที่มีต้นถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร เช่นเดียวกับการรายงานของ Macdicken *et al*.,(1997) ได้ใช้พืชตระกูลถั่ว *Calapogonium, Crotoleria, Mucuna* และ *Pueraria* ควบคุมหญ้าคา พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดี และพบว่า เมื่อเริ่มเข้าสู่เดือนที่ 6 ซึ่งตรงกับช่วงฤดูหนาว การเจริญเติบโตของถั่ว *C. caeruleum* ลดลง เนื่องจากเป็นช่วงออกดอกและติดเมล็ด มีผลทำให้การแข่งขันกับหญ้าคาลดลง (ตารางที่ 3)

<u>จำนวนต้นต่อตารางเมตร และน้ำหนักแห้งหญ้าคา</u>

เมื่อสุ่มนับจำนวนต้นหญ้าคาในระยะ 3 เดือนหลังปลูก พบว่ากรรมวิธีที่มีจำนวนต้นถั่ว *C. caeruleum* ที่ 1, 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร มีจำนวนต้นหญ้าคา ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีจำนวนต้นหญ้าคา 13.8, 10.3, 8.0 และ 6.5 ต้นต่อตารางเมตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตกับกรรมวิธีไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม โดยมีจำนวนต้นหญ้าคา 26.3 ต้นต่อตารางเมตร ในขณะที่ระยะ 4-6 เดือนหลังปลูก พบว่าทุกกรรมวิธีที่ปลูกถั่ว ***C.*** *caeruleum* มีจำนวนต้นหญ้าคาลดลง ในขณะที่กรรมวิธีที่มีจำนวนต้นถั่ว *C. caeruleum* ที่ 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตรไม่พบว่ามีหญ้าคา ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุทธาชีพ และคณะ(2533) ได้ปลูกถั่วซีรูเลียม ในแถวต้นยางพารา และไม้ผล พบว่า เมื่อถั่วซีรูเลียมเจริญเติบโตเต็มที่จะคลุมดินได้หนาแน่นจนวัชพืชอื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (ตารางที่ 4)

เมื่อสุ่มนับจำนวนต้นหญ้าในระยะ 3, 4, 5 และ 6 เดือนหลังปลูก เพื่อนำไปหาน้ำหนักแห้งวัชพืช พบว่า ที่ระยะ 3-4 เดือนหลังปลูก กรรรมวิธีที่ปลูกถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร มีน้ำหนักแห้งหญ้าคาไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ กรรรมวิธีที่ปลูกถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 1 ต้นต่อตารางเมตร และกรรมวิธีตัดวัชพืช ในขณะที่กรรมวิธีไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม มีน้ำหนักแห้งหญ้าคา มากที่สุด

ที่ระยะ 5 และ 6 เดือนหลังปลูก พบว่ากรรรมวิธีที่ปลูกถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 1 ต้นต่อตารางเมตร มีต้นหญ้าคางอกขึ้นมากขึ้น ทำให้มีน้ำแห้งมากกว่ากรรมวิธีที่ปลูกถั่ว *C. caeruleum* อื่น ๆ แต่ยังพบว่าน้อยกว่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิตกับกรรมวิธีกำจัดตัดวัชพืช และไม่มีการปลูกถั่วซีรูเลียม ในขณะที่กรรมวิธีปลูกถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร ไม่พบว่ามีจำนวนต้นหญ้าจึงไม่สามารถนำมาหาน้ำหนักแห้งวัชพืชได้ (ตารางที่ 5)

<u>ตารางที่ 1</u> จำนวนกิ่ง และความสูงเฉลี่ยของต้นถั่ว *Calopogonium caeruleum* หลังปลูก

กรรมวิธี	จำนวนกิ่งเฉลี่ยต่อต้น				ความสูงเฉลี่ยต่อต้น(ซม.)		
	1 เดือน หลังปลูก	2 เดือน หลังปลูก	3 เดือน หลังปลูก	4 เดือน หลัง ปลูก	1 เดือน หลัง ปลูก	2 เดือน หลังปลูก	3 เดือน หลังปลูก
1 ต้น/ตร.ม.	1.5	3.5	5.0	>10	47.80	118.68	261.34
2 ต้น/ตร.ม.	1.7	4.4	7.3	>10	43.07	116.82	276.55
3 ต้น/ตร.ม	1.6	4.5	7.0	>10	50.24	124.18	272.52
4 ต้น/ตร.ม	1.7	5.5	8.2	>10	52.24	123.80	252.44
วิธีตัดวัชพืช	-		-	-	-	-	-
ไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม	-		-	-	-	-	-

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพในการควบคุมหญ้าคา ที่ระยะ 15, 30, 60, 90 และ 120 หลังปลูกถั่ว *C.caeruleum*

กรรมวิธี	ประสิทธิภาพในการควบคุมหญ้าคา				
	30 วันหลังปลูก	60 วันหลังปลูก	90 วันหลังปลูก	120 วันหลังปลูก	150 วันหลังปลูก
1 ต้น/ตร.ม.	0.0	5.0	6.0	8.0	7.7
2 ต้น/ตร.ม.	0.0	6.0	8.0	9.0	8.0
3 ต้น/ตร.ม	3.0	7.0	8.0	10.0	9.5
4 ต้น/ตร.ม	3.0	7.5	9.0	10.0	10
วิธีตัดวัชพืช	-	-	-	-	-
ไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม	-	-	-	-	-

หมายเหตุ คะแนนประสิทธิภาพการควบคุมวัชพืช

0 = ไม่สามารถควบคุมวัชพืชได้ 1 – 3 = ควบคุมวัชพืชได้เพียงเล็กน้อย

4 – 6 = ควบคุมวัชพืชได้ปานกลาง 7 – 9 = ควบคุมวัชพืชได้ดี

10 = ควบคุมวัชพืชได้หมด

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่ของถั่ว *C. Caeruleum*

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การคลุมพื้นที่			
	30 วันหลังปลูก	60 วันหลังปลูก	90 วันหลังปลูก	120 วันหลังปลูก
1 ต้น/ตร.ม.	0	10	50	90
2 ต้น/ตร.ม.	2	26	70	95
3 ต้น/ตร.ม	3	35	85	100
4 ต้น/ตร.ม	5	40	90	100
วิธีตัดวัชพืช	-	-	-	-
ไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม	-	-	-	-

ตารางที่ 4 จำนวนต้นหญ้าคา (ต้นต่อตารางเมตร) หลังมีการแข่งขันกับ ถั่ว *C. Caeruleum*

กรรมวิธี	จำนวนต้นหญ้าคา(ต้นต่อตารางเมตร)			
	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
1 ต้น/ตร.ม.	13.8 ab	10.8 a	18.8 ab	26.5 a
2 ต้น/ตร.ม.	10.3 ab	4.8 a	4.0 a	5.5 a
3 ต้น/ตร.ม	8.0 a	3.0 a	2.0 a	3.0 a
4 ต้น/ตร.ม	6.5 a	1.5 a	0.0 a	2.0 a
วิธีตัดวัชพืช	18.0 ab	23.5 b	27.0 b	56.5 b
ไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม	27.0 b	29.0 b	39.5 b	76.5 c
c.v.(%)	31.60	35.20	30.70	21.45

ตารางที่ 5 น้ำหนักแห้งหญ้าคา (กรัมต่อตารางเมตร) หลังมีการแข่งขันกับ ถั่ว *C. Caeruleum*

กรรมวิธี	จำนวนต้นหญ้าคา (กรัมต่อตารางเมตร)			
	3 เดือน	4 เดือน	5 เดือน	6 เดือน
1 ต้น/ตร.ม.	10.3 b	17.1 ab	29.2 a	32.1 a
2 ต้น/ตร.ม.	7.9 a	7.9 a	3.6 a	10.2 a
3 ต้น/ตร.ม	6.5 a	4.1 a	2.9 a	4.2 a
4 ต้น/ตร.ม	4.1 a	1.2 a	0.0 a	2.6 a
วิธีตัดวัชพืช	15.4 b	29.1 b	67.7 b	121.3 b
ไม่ปลูกถั่วซีรูเลียม	39.2 c	70.3 c	110.9 c	213.5 c
c.v.(%)	32.2	48.94	31.3	23.11

ภาพที่ 1 การแข่งขันระหว่าง C. Caeruleum กับหญ้าคา ที่ 4 เดือนหลังปลูก

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ(Conclusion and Suggestion)

กิจกรรมที่ย่อย 4.1 การควบคุมสัตว์ศัตรูพืชโดยชีววิธี

การทดลองที่ 4.1.1 การผลิตและการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว*Sarcocystis singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู

สรุปผลการทดลอง

การเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของ สปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน เท่ากับ 97.82, 81.58, 68.62, 67.62, 39.84, 16.48 และ 97.72, 88.18, 79.34, 74.96, 52.74, 30.94 ตามลำดับ และเมื่อทำการเก็บรักษาระยะเวลานานสองปีขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้เหมือนกันทั้งสองวิธี

ส่วนการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* โดยวิธี Sugar flotation ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี และ 3 ปี 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเท่ากับ 95.57, 80.83, 77.07, 60.07, 53.40 และ 48.27 ตามลำดับ

ในขณะที่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ระยะเวลานานหนึ่งปีขึ้นไปนั้นไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้

การทดลองที่ 4.1.2 ศึกษาประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย*Steinernema* sp. ควบคุมทากพามาริออน *Parmarion* sp.

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย *Steinemema carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* กับ ทากพามาริออน *Parmarion* sp. ใน ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ตามแผนการทดลอง CRD จำนวน 7 กรรมวิธีๆ ละ 4 ซ้ำ โดยใช้ *S. carpocapsae*, *S. riobrave* และ *S. glaseri* แต่ละชนิดอัตรา 100,000 และ 200,000 ตัวต่อ กล่อง.และ กรรมวิธีไม่พ่นสาร หลังทดสอบ 3 วัน ไม่พบทากตาย ในแต่ละกรรมวิธี เมื่อทำการพิสูจน์ด้วยการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ก็ไม่พบไส้เดือนฝอยเข้าไปในช่องว่างของลำตัวทั้งระบบทางเดินอาหาร ระบบทางเดิน**หายใจ** และอวัยวะระบบสืบพันธุ์ของทาก และไม่พบเซลล์และเนื้อเยื่ออวัยวะระบบทางเดินอาหาร อวัยวะระบบสืบพันธุ์ และ ระบบทางเดินหายใจถูกทำลาย ทากพามาริออนจึงไม่ตาย นั่นแสดงว่าไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงเหล่านี้ไม่เฉพาะเจาะจงกับทากพามาริออน

การทดลองที่ 4.1.3 คัดเลือกชนิดและศึกษาพฤติกรรมการกินหอยทาก และการเพาะเลี้ยงหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae ในประเทศไทย

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจชนิดหอยตัวห้ำในพื้นที่เขาหินปูนและพื้นที่เกษตรกรรมอื่นตามภาคต่างๆของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2556 พบว่ามีหอยทากที่เป็นหอยตัวห้ำวงศ์ Streptaxidae จำนวน 5 genus 6 species คือ หอยนักล่าสีส้ม; *Gulella bicolor* (Hutton, 1843), หอยนักล่าสยาม; *Perrottetia siamensis* (Pfeiffer,1862), *Haploptychius petitii* (Gould, 1844), *Haploptychius* sp., *Oophana* sp. และ *Discartemon* sp. (Table 2) ผลการศึกษา feeding behavior ของหอยทากตัวห้ำทั้ง 5 genus ในห้องปฏิบัติการ พบว่าหอยตัวห้ำทุกชนิดมีพฤติกรรมการไล่ตามเหยื่อ และมีศักยภาพในการกินหอยและไข่หอยที่มีขนาดใกล้เคียงหรือขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย เฉลี่ย

สัปดาห์ละ 2-3 โดยเฉพาะอย่างยิ่งหอยนักล่าสยาม; *P. siamensis* (Pfeiffer,1862) มีศักยภาพมากที่สุด สามารถกินหอยดักดานขนาด 6.15 มิลลิเมตร (น้ำหนักเฉลี่ย 0.07 กรัม) ได้ 1-1.5 ตัว/ วัน ซึ่งการทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น วงจรชีวิต ชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรมการกินหอยหรือลักษณะการล่าของหอยทากตัวห้ำ จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกหอยทากตัวห้ำชนิดที่มีศักยภาพเพื่อพัฒนามาใช้ควบคุมหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี และช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมีเกินความจำเป็น เพื่อประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมอย่างยั่งยืนต่อไป

<u>คำแนะนำ</u> ช่วงฤดูแล้งหอยจะมีการพักตัวและหลบซ่อนอยู่ตามบริเวณใต้เปลือกไม้หรือใต้ผิวดิน ทำให้เก็บตัวอย่างหอยตัวห้ำที่ยังมีชีวิตได้ค่อนข้างน้อย จึงเป็นข้อจำกัดในการนำตัวอย่างหอยตัวห้ำแต่ละชนิดมาศึกษาชีววิทยา และเนื่องจากการสำรวจหอยตัวห้ำในประเทศไทย มีผู้ศึกษาค่อนข้างน้อย จึงควรมีการสำรวจชนิดที่มีในประเทศไทยเพิ่มเติมเพื่อได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

การทดลองที่ 4.1.4การสำรวจปรสิตในหอยวงศ์ Ariophantidae

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างหอยทากบกวงศ์ Ariophantidaeพื้นที่ป่าธรรมชาติแหล่งที่อยู่อาศัย และตามพื้นที่เกษตรกรรมในภาคต่างๆ ของประเทศ ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2557 ถึงเดือนกันยายน 2558 พบหอยทากบกจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ หอยทากสยามหรือหอยดักดาน *Cryptozonasiamensis* (Pfeiffer, 1856) หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* spp. หอยห่อเปลือกใหญ่สยาม *Megausteniasiamensis* (Haines, 1858) และหอยขัดเปลือกธรรมดา *Sarikaresplendens* (Philippi, 1843) โดยพบว่าหอยทากสยาม *Cryptozonasiamensis* (Pfeiffer, 1856)สามารถพบได้ทุกจังหวัดที่ออกเก็บตัวอย่าง ในขณะที่หอยขัดเปลือก *Macrochlamys* spp. หอยห่อเปลือกใหญ่สยาม *Megausteniasiamensis* (Haines, 1858) พบที่ภาคเหนือ โดยเฉพาะบริเวณน้ำตก และบริเวณใกล้เคียงที่ชื้นแฉะและผลการตรวจหาปรสิตจากตัวอย่างหอยทากบกด้วยวิธี digestion technique พบพบปรสิตในหอยทากสยาม *Cryptozonasiamensis* (Pfeiffer, 1856) เท่านั้นโดยปรสิตที่พบเป็นกลุ่มของหนอนตัวกลม (round – worm, nematodes) เป็นปรสิตในวงศ์ Rhabditidaeคือ *Rhabditis* spp. พบเฉพาะระยะตัวอ่อน ซึ่งมีลักษณะลำตัวเรียวยาว โดยพบได้จากตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดชุมพร และสุพรรณบุรี ซึ่งจากการทราบข้อมูลชนิดของปรสิตและโฮสต์ที่พบดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาด้านการใช้ปรสิตเพื่อการควบคุมหอยทากบกศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป เพื่อช่วยลดปริมาณการใช้สารเคมี และลดการปนเปื้อนสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อมรวมถึงพืชผลทางการเกษตรอื่นๆ ด้วย

ข้อเสนอแนะ

1.ช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นช่วงฤดูแล้ง หอยทากบกจะพักตัวตามซอกหิน ใต้ซากพืชที่ผุพัง และบางครั้งฝังตัวอยู่ใต้พื้นดิน ทำให้เก็บตัวอย่างได้ในปริมาณน้อย ควรเพิ่มระยะเวลาในการศึกษา เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว

2. ควรมีการสำรวจปรสิตในหอยทากบกในวงศ์อื่นๆ ด้วย เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบปรสิตซึ่งอาจนำมาศึกษาเพื่อใช้ควบคุมหอยทากบกศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป

กิจกรรมที่ย่อย 4.2 การควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี

การทดลองที่ 4.2.1ศักยภาพของฝอยทองในการควบคุมขี้ไก่ย่าน

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองใช้ฝอยทองในการควบคุมขี้ไก่ย่าน พบว่าฝอยทองมีศักยภาพในควบคุมขี้ไก่ย่านได้ดี การควบคุมอยู่ในลักษณะรักษาสมดุลย์ ไม่สามารถทำให้ต้นขี้ไก่ย่านหมดไปได้ ฝอยทองชนิดมีเมล็ดควบคุมต้นขี้ไก่ย่านได้เร็วกว่า ฝอยทองชนิดไม่มีเมล็ด และได้ทดลองพบว่าฝอยทองไม่เบียนต้นลำไย สามารถใช้ฝอยทองควบคุมต้นขี้ไก่ย่านที่ขึ้นปกคลุมต้นลำไยได้อย่างปลอดภัย ข้อสำคัญต้องมีการพัฒนาวิธีการปล่อยต้องให้ฝอยทองสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ก่อนการเบียนพืชที่ต้องการควบคุม และหากในพื้นที่มีวัชพืชใบแคบมาก ไม่ควรใช้ฝอยทองควบคุมในพื้นที่นั้น เนื่องจากพบว่าฝอยทองไม่สามารถเบียนต้นพืชใบแคบได้ จุดนี้อาจนำไปพัฒนาใช้ในพื้นที่ที่มีพืชปลูกใบแคบได้

การทดลองที่ 4.2.2 การศึกษาประสิทธิภาพของถั่วคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียมต่อการควบคุมหญ้าคา

สรุปผลการทดลอง

การทดลองปลูกถั่ว *C. caeruleum* ที่ใช้จำนวน 1, 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร เพื่อควบคุมหญ้าคา พบว่า ถั่ว *C. caeruleum* มีความสามารถในการแข่งขันกับหญ้าคาน้อยมากในระยะ 1-2 เดือนหลังปลูก และ ถั่ว *C. caeruleum* สามารถคลุมพื้นที่ได้ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 5 เดือนหลังปลูก และ พบว่า กรรมวิธีที่ปลูกถั่ว *C. caeruleum* จำนวน 2, 3 และ 4 ต้นต่อตารางเมตร สามารถเจริญเติบโตครอบคลุมพื้นที่ได้เร็วทำให้หญ้าคาไม่สามารถเจริญเติบโตได้และตายในที่สุด และพบจำนวนต้นหญ้าคาน้อยกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีตัดวัชพืชด้วยและไม่มีการปลูกถั่ว *C. Caeruleum.*

กิจกรรมที่ 5 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก
Pilot Centre for Mass Production of Bio-control Agent

ผู้วิจัย

พัชรีวรรณ มณีสาคร[1] อัมพร วิโนทัย[1] ประภัสสร เชยคำแหง[1] รจนา ไวยเจริญ[1]
รัตนา นชะพงษ์[1] สาทิพย์ มาลี[1] มานิตา คงชื่นสิน[1] พิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์[1]
พลอยชมพู กรวิภาสเรือง[1] อัจฉราภรณ์ ประเสริฐผล[1] สุวัฒน์ พูลพาน[1]
วาทิน จันทร์สง่า[1] สุพรรณี เป็งคำ[2]

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช[1]
ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง[2]

คำสำคัญ(key word)

แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู แตนเบียน *Anagyrus lopezi* มวนเพชฌฆาต *Sycanus* ศูนย์ต้นแบบ ศัตรูธรรมชาติ ไรตัวห้ำ หนอนนก

บทคัดย่อ (Abstracts)

กิจกรรมศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติเป็นปริมาณมาก ดำเนินการระหว่าง ระยะเวลาตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึง เดือนกันยายน 2557 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นต้นแบบในการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติ เพื่อเป็นแหล่งเรียนรู้ สาธิต เผยแพร่วิธีการผลิตขยายศัตรูธรรมชาติที่มีคุณภาพ เป็นปริมาณมากให้แก่หน่วยงาน องค์กร กลุ่มเกษตรกร และผู้สนใจ นำไปผลิตขยายเพื่อควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน เป็นการช่วยลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร ดำเนินการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการที่สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย จังหวัดเชียงใหม่ ประกอบด้วยการทดลองจำนวน 3 การทดลองได้แก่ ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเป็นปริมาณมาก ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายมวนเพชฌฆาตเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช และต้นแบบการผลิตขยายไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก โดยผลการดำเนินงาน ได้พัฒนาวิธีการการผลิตขยายแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเป็นปริมาณมากและการเก็บรักษาแตนเบียนจนสามารถปรับลดต้นทุนการผลิต จากเดิมต้นทุนการผลิต 3 – 4.50 บาท/แตนเบียน 1 คู่ สามารถปรับให้ลดลงได้เหลือ 2 บาท/ 1 คู่ ได้การจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญเพื่อเป็นเหยื่ออาหารสำหรับนำไปผลิตมวนเพชฌฆาตเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร และได้วิธีการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำให้มีปริมาณมาก

บทนำ (Introduction)

เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *Phenacoccus manihoti* เป็นแมลงศัตรูพืชต่างถิ่น มีรายงานการระบาดในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อปี 2551 ทำให้ผลผลิตมันสำปะหลังลดลง มีคุณภาพหรือเปอร์เซ็นต์แป้งลดลง และประการที่สำคัญเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูที่เข้าทำลายมันสำปะหลังจะทำให้ท่อนพันธุ์เสียหายไม่สามารถนำมาใช้เป็นท่อนพันธุ์ปลูกต่อได้ ทำให้เกิดการขาดแคลนท่อนพันธุ์มันสำปะหลังสำหรับใช้ปลูกในฤดูต่อไป จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2553) ปัญหาการระบาดของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้ส่งผลกระทบต่อภาคอุตสาหกรรมและการส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังที่สามารถ

นำเงินตราเข้าประเทศสูงถึง 51,337 ล้านบาท ในปีการผลิต 2552 และ 33,797 ล้านบาท ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม 2553 มีปัญหาการระบาดของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูทำให้เกิดภาวะขาดแคลนวัตถุดิบป้อนโรงงานแป้งมันและผลิตภัณฑ์มันสำปะหลัง ทั้งตัวเกษตรกร ผู้ประกอบการ และผู้ใช้ผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเกิดความตระหนก และไม่มั่นใจในการผลิตมันสำปะหลังของไทย ทำให้ผู้บริโภคหันไปใช้วัตถุดิบอื่นๆ ทดแทน ดังนั้นเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูจึงนับว่าเป็นแมลงศัตรูมันสำปะหลังที่สำคัญที่สุด

กรมวิชาการเกษตรซึ่งรับผิดชอบดูแลงานวิจัยด้านพืชและแก้ปัญหาศัตรูพืช ได้มีการดำเนินงานวิจัยเพื่อแก้ปัญหาเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูที่ระบาดในมันสำปะหลัง โดยการนำเข้าแตนเบียน *Anagyrus lopezi* จากสาธารณรัฐเบนิน เพื่อศึกษาทดสอบความปลอดภัยในการนำมาใช้ควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูในประเทศไทย และพบว่าการใช้แตนเบียน *A. lopezi* มีความปลอดภัย ไม่ส่งผลกระทบในทางลบต่อสภาพการเพาะปลูกและสภาพแวดล้อมของประเทศไทย นอกจากนั้นแตนเบียน *A. lopezi* ยังมีประสิทธิภาพสูงในการนำไปใช้ควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู การขยายผลและเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยงเป็นปริมาณมาก เพื่อปล่อยควบคุมการระบาดในไร่เกษตรกรให้ทันกับความต้องการ จะช่วยลดความเสียหายอันเนื่องมาจากเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้ แต่การเพาะเลี้ยงแตนเบียน *A. lopezi* เป็นจำนวนมากยังคงมีปัญหาในด้านการผลิตขยายเพลี้ยแป้งสำปะหลังสีชมพู คุณภาพของแตนเบียนและต้นทุนการผลิตที่สูงมาก (ประมาณคู่ละ 3.00 - 4.50 บาท) จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแตนเบียน *A. lopezi* เป็นปริมาณมากโดยมีต้นทุนการผลิตที่เหมาะสม

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีเป็นองค์ประกอบหลักที่จะทำให้เกิดความสำเร็จต่อแนวทางการแก้ไขปัญหาทั้งปัญหาศัตรูพืชที่ทำลายผลผลิตทางการเกษตร และการป้องกันสิ่งแวดล้อม ของระบบนิเวศในธรรมชาติ ดังนั้นความพยายามในการควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี จึงเป็นสิ่งที่ขาดไม่ได้ในปัจจุบันและอนาคต มวนเพชฌฆาต genus *Sycanus* ในประเทศไทยที่พบมีหลายชนิดแต่ *Sycanus versicolor* Dohrn เป็นแมลงห้ำที่มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก และหนอนใยผัก เป็นต้น ซึ่งศัตรูพืชเหล่านี้กำลังเป็นปัญหากับพืชผัก ไม้ดอก ไม้ผล และพืชไร่หลายชนิดเนื่องจากแมลงดังกล่าวสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงจึงมีแนวโน้มว่าจะเพิ่มความสำคัญมากขึ้นเรื่อยๆสำหรับประเทศไทย รัตนา (2551) รายงานว่ากองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการวิจัยการนำมวนตัวห้ำได้แก่มวนพิฆาต (stink bug) *Eocanthecona furcellata* (Wolff) ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชได้แก่ หนอนกระทู้หอม, หนอนเจาะสมอฝ้าย, หนอนกระทู้ผักได้ประสบผลสำเร็จสูงในองุ่น, หน่อไม้ฝรั่ง, ถั่วฝักยาว, ถั่วเหลือง ทั้งมีศึกษาการผลิตอย่างเป็นระบบสามารถผลิตเป็นชีวภัณฑ์ได้ แต่ไม่สามารถใช้หนอนนกเพียงชนิดเดียวนำมาเป็นเหยื่อผลิตขยายมวนพิฆาตได้ เพราะจะทำให้มวนระยะตัวอ่อนตายสูงถึง 50% ต้องใช้หนอนนกร่วมกับหนอนกระทู้ผัก**นำ** มาเป็นเหยื่อผลิตขยายมวนพิฆาตซึ่งจะทำให้มวนระยะตัวอ่อนตายเพียง 26.71% ทำให้การผลิตมวนพิฆาตมีต้นทุนการผลิตสูง เพราะในการผลิตหนอนกระทู้ผักเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงมวนพิฆาต ต้องใช้อาหารเทียมซึ่งมีราคาแพง ในขณะที่มวนเพชฌฆาต *S. versicolor* สามารถใช้หนอนนกเพียงชนิดเดียวนำมาเป็นเหยื่อเลี้ยงขยายได้ซึ่งการผลิตหนอนนกเพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารเลี้ยงมวนเพชฌฆาตใช้อาหารไก่เลี้ยงซึ่งมีราคาถูกกว่ามากและไม่เสียแรงงานในการเตรียมอาหาร ทำให้มีต้นทุนการเลี้ยงต่ำกว่าการเลี้ยงมวนพิฆาต ดังนั้นการนำมวนเพชฌฆาตไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชนอกจากจะได้ประสบผลสำเร็จแล้วยังคุ้มทุน เพราะมวนเพชฌฆาตสามารถผลิตได้ง่ายในราคาต่ำกว่าการใช้สารเคมีฆ่าแมลง นอกจากนี้ยังช่วยลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ช่วยเพิ่มความปลอดภัยด้านสุขภาพอนามัยของ

ผู้ผลิตและสิ่งแวดล้อม สุขภาพอนามัยสำหรับผู้บริโภค การนำมวนเพชฌฆาตไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำเอาไปใช้ได้ในระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน แต่ในการนำมวนเพชฌฆาตไปใช้ประโยชน์ยังไม่สามารถทำได้อย่างยั่งยืน เนื่องจากทั้งมวนเพชฌฆาตและเหยื่ออาหาร (หนอนนก) ขาดระบบการผลิตที่รวดเร็ว เป็นระบบ แม่นยำ ต่อเนื่อง และต้นทุนต่ำ และจากผลสำเร็จของเทคนิคการเลี้ยงขยายพันธุ์มวนเพชฌฆาตและเหยื่ออาหาร (หนอนนก) ที่มีการศึกษามาแล้ว รัตนา (2544) รายงานว่า หนอนนก : mealworm, *Tenebrio molitor* L. อยู่ในอันดับ Coleoptera วงศ์ Tenebrionidae ตัวเต็มวัยของหนอนนกอายุ 6 - 7 วัน จะเริ่มผสมพันธุ์ หลังจากนี้อีก 3 - 4 วัน จะเริ่มวางไข่มีลักษณะเป็นรูปไข่ (oval shape) สีขาวนวล เป็นฟองเดี่ยว หรือเป็นกลุ่มมีเศษอาหารปกคลุม ตัวเมีย 1 ตัว สามารถวางไข่ได้ประมาณ 80 - 100 ฟอง ไข่มีอายุประมาณ 7 วัน จึงฟักเป็นตัวหนอนวัย 1 หนอนมีการลอกคราบ 13 ครั้ง ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 80 - 90 วัน หนอนโตเต็มที่มีขนาดขาว 2.8 ซม. กว้าง 0.3 เซนติเมตร หนอนลอกคราบครั้งสุดท้ายจะกลายเป็นดักแด้สีขาวอมน้ำตาลอ่อนมีขนาดยาว 1.4 - 1.8 ซม. มีอายุ 7 วัน แล้วจะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยสีดำ ซึ่งเป็นพวกด้วง มีขนาดยาว 1.5 ซม. กว้าง 0.5 ซม. มีอายุประมาณ 45 วัน รัตนา (2554) รายงานอีกว่า การผลิตมวนเพชฌฆาตโดยใช้ดักแด้หนอนนกเป็นอาหารในกล่องพลาสติก โดยการเลี้ยงมวนเพชฌฆาตตัวอ่อนวัย 1-2 จำนวนประมาณ 600 ตัว/กล่อง ใช้ดักแด้หนอนนกจำนวน 100 ดักแด้/กล่อง/อาทิตย์ เป็นอาหาร การเลี้ยงมวนเพชฌฆาตตัวอ่อนวัย 3-5 จำนวน 150 ตัว/กล่อง ใช้ดักแด้หนอนนกจำนวน 400 ตัว/กล่อง/อาทิตย์ เป็นอาหาร และการเลี้ยงมวนเพชฌฆาตตัวเต็มวัย จำนวน 40 คู่ ใช้หนอนนกจำนวน 320 ตัว/กล่อง/อาทิตย์ ดังนั้นการจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกเป็นขั้นตอน เพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารสำหรับนำไปผลิตมวนเพชฌฆาตเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร ซึ่งคำนึงถึงต้นทุนการผลิต จำนวนผลผลิต และระยะเวลาการผลิตที่แน่นอน โดยมีวิธีการผลิตที่เหมาะสม สะดวก ง่าย ประหยัด แต่มีประสิทธิภาพ สำหรับเป็นต้นแบบในการผลิตขยายเป็นปริมาณมากจึงสมควรดำเนินการ

เป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าการควบคุมโดยชีววิธี (Biological control) สำหรับไรศัตรูพืชนั้น วิธีการที่เป็นไปได้และสัมฤทธิ์ผลมากที่สุด คือ การใช้ไรตัวห้ำที่มีประสิทธิภาพปล่อยลงในแปลงปลูกพืช (McMurtry and Croft, 1997) ซึ่งขั้นตอนที่นับว่าเป็นหัวใจของวิธีการนี้ ก็คือ การผลิตไรตัวห้ำให้ได้เป็นปริมาณมาก หากไรตัวห้ำที่มีศักยภาพกินเหยื่อได้ดี แต่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงขยายประชากรได้ การใช้ประโยชน์ก็จะไม่เกิดขึ้น การเลี้ยงขยายไรตัวห้ำให้ได้ปริมาณมากมีความสลับซับซ้อนขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต 3 สิ่ง ได้แก่ 1) ไรตัวห้ำ 2) เหยื่อของไรตัวห้ำ และ 3) พืชอาศัยของเหยื่อ ผู้เลี้ยงต้องทราบชนิดของเหยื่อที่ไรตัวห้ำชอบกินมากที่สุด ทราบชนิดพืชอาศัยของเหยื่อที่เหมาะสมมากที่สุด ในกรณีที่เหยื่อเป็นไรแมงมุม สิ่งที่ต้องทราบ คือ ชนิดพืชอาศัยที่ไรแมงมุมชนิดนั้นชอบดูดกินและขยายพันธุ์ได้เป็นปริมาณมาก พืชอาศัยต้องปลูกง่ายเติบโตเร็ว รวมทั้งต้องทราบจำนวนไรตัวห้ำที่ใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์เริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม โดยต้องให้ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 สิ่งนี้มีสมดุลให้มากที่สุด ทั้งนี้เพื่อให้การเพาะเลี้ยงในแต่ละรอบใช้เวลาสั้นที่สุด แต่ได้จำนวนไรตัวห้ำมากที่สุด

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ไรตัวห้ำชนิดที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ควบคุมไรศัตรูพืชในประเทศไทย ได้แก่ *Amblyseius* (= *Neoseiulus*) *longispinosus* (Evans) และ *A. californicus* (McGregor) ให้เป็นต้นแบบการผลิตไรตัวห้ำเป็นปริมาณมากได้อย่างต่อเนื่อง โดยมีเป้าหมายถ่ายทอดให้เกษตรกรและผู้สนใจสามารถนำไปปฏิบัติตามหรือนำไปผลิตเพื่อเป็นการค้าได้ นอกจากนั้น ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำที่มีศักยภาพอีกชนิดหนึ่ง คือ *A. cinctus* Corpuz and Rimando ซึ่งมีอาหารและวิธีการเพาะเลี้ยงแตกต่างจากไรตัวห้ำสองชนิดข้างต้น

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methology)

การทดลองที่ 5.1 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังเป็นปริมาณมาก

วิธีดำเนินการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาพันธุ์มันสำปะหลังที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *Phenacoccus manihoti*

อุปกรณ์

7. โรงเรือนป้องกันการรบกวนจากเพลี้ยแป้งและแตนเบียนชนิดอื่นๆ จากธรรมชาติ
8. พู่กันขนาดเล็ก
9. สำลี
10. กระถางปลูกต้นไม้
11. ดินปลูก
12. กล่องพลาสติกใส
13. เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti*
14. ท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง จำนวน 15 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่
    - 8.1. KU 50
    - 8.2. B 113
    - 8.3. B 127
    - 8.4. CMR 45-27-76
    - 8.5. CMR 45-47-137
    - 8.6 CMR 48-53-48
    - 8.7 CMR 49-54-10
    - 8.8 CMR 49-54-67
    - 8.9 CMR 46-39-42
    - 8.10 R 9
    - 8.11 R 11
    - 8.12 R 72
    - 8.13 R 5
    - 8.14 HB 80
    - 8.15 5 Min

วิธีการ

ทำการคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ให้ได้ปริมาณสูงสุด จากจำนวน 15 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยวางแผนการทดลองแบบ RCB 15 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

1) ปลูกมันสำปะหลัง 15 พันธุ์/สายพันธุ์ อย่างละ 4 ต้น โดยปลูกกระถางละ 1 ต้น ดูแลต้นมันสำปะหลังที่ปลูกให้เจริญเติบโตจนมีอายุได้ 30 วัน เพื่อนำไปใช้เลี้ยงเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

2) นำเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูวัย 2 จำนวน 20 ตัว/ต้น ลงเลี้ยงบนต้นมันสำปะหลังทั้ง 15 พันธุ์/สายพันธุ์

3) บันทึกจำนวนของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูทุก 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ

เวลาและสถานที่

- ทำการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2554 ถึงเดือนกันยายน 2555
- กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง อ.เมือง จ.ระยอง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพแตนเบียน *A. lopezi* ต่อการควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูบนผลฟักทองและต้นมันสำปะหลัง

ทำการศึกษาประสิทธิภาพการเบียนของแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *A. lopezi* บนต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 และฟักทองที่คัดเลือกแล้วว่าสามารถเลี้ยงขยายปริมาณเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้จำนวนสูงสุด เพื่อทดสอบหาอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการเบียนของแตนเบียน *A. lopezi* กับจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

อุปกรณ์

1. โรงเรือนทดลอง
2. กล่องพลาสติกทรงกระบอก
3. เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti*
4. แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *A. lopezi*
5. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11
6. ฟักทอง ลักษณะผิวเรียบ และเขียว
7. กรงตาข่ายสำหรับทดลองต้นมันสำปะหลัง ขนาด 0.5 x 1 x 1 เมตร
8. กรงตาข่ายสำหรับทดลองผลฟักทอง ขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 เมตร

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 ซ้ำ 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ปล่อยแตนเบียน 1 คู่ ในกรงต้นมันสำปะหลังที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 2 ปล่อยแตนเบียน 5 คู่ ในกรงปลูกต้นมันสำปะหลังที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 3 ปล่อยแตนเบียน 10 คู่ ในกรงปลูกต้นมันสำปะหลังที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 4 ปล่อยแตนเบียน 15 คู่ ในกรงปลูกต้นมันสำปะหลังที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 5 ปล่อยแตนเบียน 1 คู่ ในกรงที่มีผลฟักทองที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 6 ปล่อยแตนเบียน 5 คู่ ในกรงที่มีผลฟักทองที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 7 ปล่อยแตนเบียน 10 คู่ ในกรงที่มีผลฟักทองที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว
กรรมวิธีที่ 8 ปล่อยแตนเบียน 15 คู่ ในกรงที่มีผลฟักทองที่มีเพลี้ยแป้ง จำนวน 100 ตัว

1) ปลูกมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 และนำผลฟักทองที่เตรียมไว้ ทำการเลี้ยงเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู จนได้วัย 3 ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบ

2) เตรียมแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ตามจำนวนที่ต้องการใช้ จากนั้นปล่อยในกรงพืชอาหารที่มีเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูตามจำนวนที่กำหนดในแต่ละกรรมวิธี

3) สังเกตและเปรียบเทียบลักษณะการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูในแต่ละกรรมวิธี และการพัฒนาเพิ่มจำนวนของแตนเบียนในกรงพืชทดสอบแต่ละชนิด

4) บันทึกผลการทดลอง

- ตรวจนับจำนวนแตนเบียน *A. lopezi* เพศผู้และเพศเมีย ตั้งแต่เริ่มออกจากมัมมี่เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ทุกวันเว้นวัน ในช่วงระยะเวลา 10 วัน (5 ครั้ง)
- บันทึกข้อมูลอัตราการเพิ่มจำนวนของแตนเบียน *A. lopezi* ที่ปล่อยและแตนเบียน *A. lopezi* ที่เพิ่มขึ้นในทุกกรรมวิธี

เวลาและสถานที่

- ทำการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2556
- กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแตนเบียน *A. lopezi*

ทำการทดสอบปริมาณแตนเบียนที่เก็บรักษาในจำนวนที่แตกต่างกันในระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่

1. อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส
2. อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส
3. อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส
4. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
5. อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

อุปกรณ์

1. เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti*
2. แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *A. lopezi.*
3. หลอดพลาสติกใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 5 ซม.
4. ต้นมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11
5. ฟักทอง ลักษณะผิวเรียบ และเขียว
6. กรงตาข่ายสำหรับทดลองต้นมันสำปะหลัง ขนาด 0.5 x 1 x 1 เมตร
7. กรงตาข่ายสำหรับทดลองผลฟักทอง ขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 เมตร
8. กล่องพลาสติกทรงกระบอก

วิธีการ วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 10 ซ้ำ

1. จำนวนแตนเบียน 20 คู่
2. จำนวนแตนเบียน 25 คู่
3. จำนวนแตนเบียน 30 คู่
4. จำนวนแตนเบียน 35 คู่

1) เพาะเลี้ยงแตนเบียน *A. lopezi* ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบและเลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูวัย 3 สำหรับใช้ในการทดสอบ

2) บรรจุแตนเบียน *A. lopezi* ลงในหลอดพลาสติกใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม. สูง 5 ซม. หลังฟักออกจากมัมมี่ 1 วัน ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบในแต่ละกรรมวิธี จากนั้นนำเก็บรักษาที่อุณหภูมิระดับต่างๆ ตามที่กำหนดครั้งละอุณหภูมิ

3) บันทึกการเปลี่ยนแปลงและการอยู่รอดของแตนเบียน *A. lopezi* ในแต่ละกรรมวิธีทุกวันเว้นวัน

4) นำแตนเบียน *A. lopezi* ที่เก็บรักษาในแต่ละกรรมวิธีเป็นระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน มาทดสอบประสิทธิภาพการเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู โดยนำแตนเบียน *A. lopezi* เพศเมียใส่ลงในขวดพลาสติกที่มีเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูวัย 3 จำนวน 20 ตัว

5) บันทึกข้อมูลทุกวันเว้นวัน โดยบันทึกจำนวนแตนเบียน *A. lopezi* ที่มีชีวิตรอด ในแต่ละกรรมวิธี ที่อุณหภูมิการเก็บรักษาต่างๆ ทุกวันเว้นวัน และบันทึกจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูที่ถูกเบียนด้วยแตนเบียน *A. lopezi* ที่ผ่านการเก็บรักษาตามกรรมวิธีต่างๆ

การทดลอง 5.2 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายมวนเพชฌฆาตเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ชั้นเลี้ยงแมลง, เพลทพลาสติกขนาด 9 เซนติเมตร, กล่องพลาสติกขนาด 5 x 7.5 และ 18.5 x 27.5 เซนติเมตร และถาดพลาสติกขนาด 28 x 42 เซนติเมตร
2. หนอนนก
3. พู่กัน, ปากคีบ, ตะแกรงสำหรับร่อนเศษอาหารละเอียด, ตะกร้าสำหรับร่อนตัวเต็มวัยออกจากอาหาร, พัดหรือพัดลมสำหรับพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และสำลีหรือเศษผ้ายืดสำหรับให้น้ำและความชื้นหนอนนก
4. น้ำ และอาหารไก่ใหญ่สำหรับเลี้ยงหนอนนก
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งสำหรับชั่งน้ำหนักดักแด้หนอนนก
6. เครื่องชั่งธรรมดาสำหรับชั่งน้ำหนักอาหารไก่
7. กล้องจุลทรรศน์ และ counter

- วิธีการ

การจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกเป็นขั้นตอน เพื่อเป็นเหยื่ออาหารสำหรับนำไปผลิตมวนเพชฌฆาตเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร สำหรับเป็นต้นแบบในการผลิตขยาย ดำเนินการโดยเลี้ยงขยายหนอนนกให้ได้ดักแด้ปริมาณมาก เพื่อคัดดักแด้ที่มีขนาดใหญ่และสมบรูณ์ สำหรับเป็น stock culture เพื่อใช้ในการทดลอง โดยนำหนอนนกที่ซื้อจากร้าน (หนอนนกมีขนาดเล็กไม่สมบรูณ์เนื่องจากขาดอาหาร) จำนวน 8 กิโลกรัม มาเลี้ยงขยายในถาดพลาสติกโดยใส่หนอนนกจำนวน 200 กรัมต่อถาด ด้วยอาหารไก่ใหญ่ เริ่มทดลองดังนี้

1. ระยะการเจริญเติบโตของหนอนนก อัตราการตายของหนอน อัตราการตายของดักแด้และความสามารถในการขยายพันธุ์ของหนอนนก

เริ่มการทดลองโดยคัดดักแด้หนอนนกที่มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์จำนวน 100 ตัว ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 18.5 X 27.5 เซนติเมตร ที่ปูพื้นกล่องด้วยกระดาษที่พับเป็นจีบเล็กๆแบบพัด ขนาดเท่ากล่อง โรยอาหารไก่ลงไปเพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัย เมื่อดักแด้ลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย จะเริ่มวางไข่บนกระดาษ เก็บแผ่นกระดาษที่มีไข่หนอนนกติดอยู่มาเริ่มศึกษา ตัดกระดาษที่มีไข่หนอนนก ใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 5 x 7.5 เซนติเมตร จำนวน 2 - 3 กลุ่ม/กล่อง จำนวน 20 กล่อง เมื่อไข่ฟักเป็นตัวหนอนวัย 1 นับจำนวนหนอนให้เหลือ 10 ตัว/กล่อง ที่เหลือเขี่ยทิ้ง และใส่อาหารไก่ลงในกล่อง เมื่อหนอนเข้าดักแด้เก็บดักแด้ใส่ลงในกล่องใบใหม่ที่ปูด้วยกระดาษที่พับเป็นจีบเล็กๆแบบพัด สำหรับใช้เป็นที่วางไข่ พร้อมใส่อาหารไก่ แบ่งกล่องที่มีตัวเต็มวัยนี้ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนละ 10 กล่อง โดยส่วนที่1 ใส่สำลีชุบน้ำพอหมาดที่วางอยู่ในเพลทลงในกล่อง เพื่อเป็นอาหารและให้ความชื้นแก่ ตัวเต็มวัยและส่วนที่ 2 ไม่ใส่สำลีชุบน้ำ นับจำนวนเพศผู้และเพศเมียในแต่ละกล่อง เมื่อตัวเต็มวัยเริ่มวางไข่บนกระดาษ เก็บแผ่นกระดาษที่มีไข่หนอนติดอยู่ทุกวันพร้อมตรวจดูจำนวนเพศเมียที่เหลือจนกว่าตัวเต็มวัยตาย

การบันทึกข้อมูล ระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ ระยะตัวเต็มวัย ระยะวางไข่ จำนวนตายของหนอนและดักแด้ และจำนวนไข่ที่วางต่อตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัว

2. จัดทำระบบการผลิตหนอนนกเพื่อเป็นเหยื่ออาหารของมวนเพชฌฆาตด้วยขั้นตอนต่างๆ

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาก่อน พบว่าการเลี้ยงมวนมวนเพชฌฆาตวัย 1 – 5 และตัวเต็มวัยจำนวน 830 ตัว/สัปดาห์ จะต้องใช้หนอนนกและดักแด้หนอนนกจำนวนทั้งหมด 1,070 ตัว/สัปดาห์

ต้องการผลิตหนอนนกให้ได้ 12,900 ตัว/สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นเหยื่ออาหารสำหรับการผลิตขยายมวนเพชฌฆาต 1 ชุด จำนวน 10,000 ตัว ซึ่งจะมีมวนเพชฌฆาตวัย 1 – 5 และตัวเต็มวัย

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 1 มาจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร ดำเนินการโดยคัดดักแด้หนอนนกที่มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์ จาก stock culture มาเลี้ยงขยายด้วยอาหารไก่ใหญ่ในถาดพลาสติกจนเข้าดักแด้มาเริ่มศึกษาโดยมีขั้นตอนดังนี้

1) นำดักแด้ใส่ลงในถาดพลาสติก

2) ทิ้งไว้ดักแด้จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย โรยอาหารไก่ใหญ่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลงในถาดเพื่อเป็นอาหารแก่ตัวเต็มวัย สำหรับการเลี้ยงตัวเต็มวัยแบบให้น้ำจะใส่สำลีหรือเศษผ้ายืดหรือผ้าสำลีขนาด 4x4 ตารางนิ้ว ชุบน้ำพอหมาดลงไปในถาด

3) ตัวเต็มวัยจะเริ่มวางไข่ติดบนพื้นถาด เก็บไข่หนอนนกโดยใช้ตะกร้าร่อนตัวเต็มวัยออกจากอาหาร นำตัวเต็มวัยใส่ลงในถาดใบใหม่พร้อมใส่อาหารไก่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลงในถาด พร้อมใส่สำลีหรือเศษผ้ายืดหรือผ้าสำลีขนาด 4x4 ตารางนิ้ว ชุบน้ำพอหมาดสำหรับการเลี้ยงตัวเต็มวัยแบบให้น้ำจนกว่าตัวเต็มวัยตาย

4) ส่วนอาหารทั้งหมดที่ร่อนออกมานำกลับมาใส่ในถาดไข่ดังเดิมเพื่อนำมาเลี้ยงต่อไป การเก็บไข่ทำทุก 20 วัน/ครั้ง จนกว่าตัวเต็มวัยตาย

5) เลี้ยงหนอนนกตั้งแต่วัย 1 - 13 ด้วยอาหารไก่ เมื่ออาหารในถาดถูกกินจนป่นจะเติมอาหารอีก เมื่อหนอนนกลอกคราบครั้งสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นดักแด้ อาหารจะถูกกินจนป่นเกือบหมด

6) เก็บดักแด้ใส่ถาดใบใหม่นำไปเลี้ยงต่อไป และนำถาดเลี้ยงเดิมไปล้างทำความสะอาดตากแดด

7) ดักแด้บางส่วนที่ยังไม่ต้องการเลี้ยงต่อ นำมาใส่ในกล่องพลาสติกที่ปูด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์โรยดักแด้กระจายให้ทั่ว ปิดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ นำไปเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

8) ถาดเลี้ยงหนอนตั้งแต่วัย 1-13 จะทำความสะอาดโดยใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และใช้ตะแกรงร่อนเศษอาหารที่ป่นและมูลหนอนออกทิ้ง และในช่วงที่หนอนกำลังเข้าดักแด้จะใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกไปเพื่อสะดวกในการเก็บดักแด้

บันทึกวิธีการปฏิบัติที่เหมาะสมเท่าที่จำเป็นอย่างเป็นระบบ, ปริมาณหนอนนกที่มีขนาดเหมาะสมสำหรับนำไปเลี้ยงมวนเพชฌฆาต และปริมาณดักแด้ที่ผลิตได้, ปริมาณอาหารไก่ที่ใช้ ต้นทุนการผลิต และระยะเวลาการผลิตที่แน่นอนต่อหน่วยการผลิต (ถาด)

- **เวลาและสถานที่**

เริ่มต้น 2555 สิ้นสุด 2555

ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลอง 5.3 ต้นแบบการผลิตขยายไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก

วิธีดำเนินการ

1 จัดทำรูปแบบวิธีเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ 3 ชนิด ได้แก่ *Amblyseius longispinosus*, *A. californicus* และ *A. cinctus*

2 คำนวณต้นทุนการผลิตในการผลิตไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก

ผลการวิจัยและอภิปรายผล (Result and Discussion)

การทดลอง 5.1ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเป็นปริมาณมาก
ผลการทดลอง
ขั้นตอนที่ 1

การศึกษาพันธุ์มันสำปะหลังที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* ในสายพันธุ์มันสำปะหลังที่ทำการทดสอบจำนวน 15 พันธุ์/สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

จากการตรวจนับจำนวนเพลี้ยแป้งหลังปล่อย 1 สัปดาห์ พบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ โดยพบว่าพันธุ์/สายพันธุ์มันสำปะหลัง ที่พบจำนวนของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* สูงสุด จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ KU50, R5, R9, CMR 45-27-76 และ R11 โดยจำนวนที่พบเท่ากับ 36.3, 35, 33.8, 31.8 และ 30 ตัว/ต้น ตามลำดับ

การตรวจนับจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* หลังปล่อย 2 สัปดาห์ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบ พันธุ์/สายพันธุ์ มันสำปะหลังที่พบจำนวนของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* สูงสุด จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ R11, CMR 45-47-137, CMR 49-54-10, R5 และ CMR 48-53-48 โดยจำนวนที่พบเท่ากับ 131.3, 113.8, 108, 88.8 และ 88.8 ตัว/ต้น ตามลำดับ

และจากการตรวจนับจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* หลังปล่อย 3 สัปดาห์ พบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ โดยพบว่า สายพันธุ์มันสำปะหลังที่พบจำนวนของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* สูงสุด จำนวน 5 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ CMR 48-53-48, R11, CMR 49-54-67, R5 และ CMR 49-54-10 พบจำนวนเพลี้ยแป้งเท่ากับ 376.5, 338, 287, 230.5 และ 220 ตัว/ต้น ตามลำดับ

จากผลการตรวจนับปริมาณของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* ทั้ง 3 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู เข้าทำลายมันสำปะหลังพันธุ์ R11 มีปริมาณมากที่สุด จึงเหมาะกับการนำมาใช้เพาะเลี้ยงขยายปริมาณเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูมากที่สุด

Table 1 Average number of Pink Cassava Mealybug (PCM) on different cassava varieties host plants.

Cassava Varieties	Ave. No. of *P. manihoti* per plant		
	1st week	2nd week	3rd week
KU50	36.3 a	85.5 ab	185.0 a
B113	25.5 a	80.5 ab	140.8 a
B127	30.8 a	85.0 ab	203.8 a
Cmr45-27-76	31.8 a	57.8 ab	116.8 a
Cmr45-47-137	27.8 a	113.8 ab	118.0 a
Cmr48-53-48	27.3 a	88.8 ab	376.5 a
Cmr49-54-10	30.0 a	108.0 ab	220.0 a

Cmr49-54-67	30.0 a	83.0 ab	287.0 a
Cmr46-39-42	26.5 a	71.8 ab	190.0 a
R9	33.8 a	44.3 ab	117.5 a
R11	30.0 a	131.3 a	338.8 a
R72	22.3 a	52.0 ab	103.3 a
R5	35.0 a	88.8 ab	230.5 a
HB80	17.3 a	36.0 b	153.5 a
5Min	26.5 a	66.8 ab	180.0 a
CV (%)	39.5	68.2	85.8

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพแตนเบียน *A. lopezi* ต่อการควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูบนผลฟักทองและต้นมันสำปะหลัง

จากผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงขยายปริมาณแตนเบียน *A. lopezi* จากเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูบนต้นมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูด้วยการเลี้ยงบนผลฟักทอง พบว่าจำนวนเฉลี่ยแตนเบียนเพศผู้ที่ได้จากการปล่อยแตนเบียนที่เริ่มต้น 15 คู่ ไม่แตกต่างทางสถิติคือ 40.2 และ 45 ตัว ตามลำดับและการปล่อยแตนเบียนที่เริ่มต้น 10 และ 5 คู่ ให้ผลไม่แตกต่างทางสถิติคือ 35.2, 34.8 และ 26.6, 35.6 ตัวตามลำดับ ส่วนการปล่อยแตนเบียนเริ่มต้น 1 คู่ ให้ผลไม่แตกต่างเช่นเดียวกันคือ 21.4 และ 22 ตัวตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบรวมทุกกรรมวิธีพบว่าการปล่อยแตนเบียนเริ่มต้น 15 คู่ ในผลฟักทอง ให้ผลผลิตจำนวนแตนเบียนสูงสุด โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ปล่อยแตนเบียนเริ่มต้น 10 และ 5 คู่ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติจากกรรมวิธีปล่อยแตนเบียนเริ่มต้น 5 คู่ และ 1 คู่ ในมันสำปะหลัง

จำนวนเฉลี่ยแตนเบียนเพศเมียที่ได้จากการเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ที่เลี้ยงด้วยต้นมันสำปะหลังและผลฟักทองเมื่อเปรียบเทียบทางสถิติแล้ว พบว่ากรรมวิธีที่ 2 - 8 ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติคือ 30.6, 31, 34.8, 24.2, 33, 33 และ 31.6 ตัว ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 1 คือ 20.4 ตัว

เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเฉลี่ยรวมแตนเบียนทั้งหมดที่ได้จากกรรมวิธีต่างๆ พบว่ากรรมวิธีที่ 4 และ 8 ได้จำนวนผลผลิตแตนเบียน *A. lopezi* สูงสุดคือ 75 และ 76.6 ตัว ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 3, 6 และ 7 คือ 66.2, 68.6 และ 67.8 ตัว ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับกรรมวิธีที่ 1 และ 5 คือ 41.8 และ 46.2 ตัว ตามลำดับ

สำหรับอัตราส่วนจำนวนเพศผู้และเพศเมียของแตนเบียน *A. lopezi* พบว่าอยู่ในระดับ 1 : 0.70 - 1.15 ตัว ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราส่วนของแตนเบียนเพศเมียลดลงเมื่อปล่อยแตนเบียนเริ่มต้นในจำนวนสูงขึ้น ซึ่งอาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้ต่อไป

ส่วนการเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนแตนเบียน *A. lopezi* ที่ได้ พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของแตนเบียนที่ปล่อยเริ่มต้นจำนวนน้อย คือ 1 คู่ ในกรรมวิธีที่ 1 และ 5 มีอัตราการเพิ่มขึ้นสูง

20.9 และ 23.1 เท่า ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการปล่อย 5 คู่ ในกรรมวิธีที่ 2 และ 6 คือ 5.72 และ 6.86 เท่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการปล่อย 10 และ 15 คู่ ในกรรมวิธีที่ 3, 4 คือ 3.31, 2.50 และ กรรมวิธีที่ 7, 8 คือ 3.39, 2.55 เท่า ตามลำดับ

จากผลการทดสอบเห็นได้ว่าอัตราของผลผลิตแตนเบียน *A. lopezi* ที่เพิ่มขึ้นจากการปล่อยเริ่มต้นเพียง 1 คู่ สามารถเบียนและทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ถึงเรื่องของความอยู่รอดและความต้องการแพร่ขยายพันธุ์ต่อไป ในกรณีที่ปล่อยแตนเบียนเริ่มต้นจำนวนมากขึ้นการแก่งแย่งในการเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูมีสูงขึ้น เนื่องจากการจำกัดจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ในอัตราเพียง 100 ตัว เท่ากันในทุกกรรมวิธี ทำให้แตนเบียนถูกจำกัดความสามารถในการเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู โดยจากการปล่อยแตนเบียน 1, 5, 10 และ 15 คู่ แตนเบียน *A. lopezi* สามารถเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ได้อยู่ที่ระดับ 41.8–46.2%, 57.2–68.6%, 66.2–67.8% และ 75–76.6% ตามลำดับ เนื่องจากแตนเบียน 1 ตัว สามารถเบียนและวางไข่ในตัวเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้ 1 ฟอง/เพลี้ย 1 ตัว และในหนึ่งวันสามารถเบียนและวางไข่ในตัวเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้ 15-20 ตัว (อัมพร, 2553) (ตารางที่ 2)

Table 2 Comparison averages yields of male and female of *Anagyrus lopezi* parasitise on *Phenacoccus manihoti* rearing on cassava plant and pumpkin.

Treatment (*A. lopezi*(Pairs) : *P. manihoti*)		No. of average yields of *A. lopezi*				
		Male	Female	Total	ratio M : F	increase rate
T1, casava	1 : 100	21.4 d	20.4 b	41.8 d	1 : 0.95	20.9 a
T2, casava	5 : 100	26.6 cd	30.6 a	57.2 bc	1 : 1.15	5.72 bc
T3, casava	10 : 100	35.2 bc	31.0 a	66.2 ab	1 : 0.88	3.31 c
T4, casava	15 : 100	40.2 ab	34.8 a	75.0 a	1 : 0.86	2.50 c
T5, pumpkin	1 : 100	22.0 d	24.2 ab	46.2 cd	1 : 1.10	23.1 a
T6, pumpkin	5 : 100	35.6 bc	33.0 a	68.6 ab	1 : 0.93	6.86 b
T7, pumpkin	10 : 100	34.8 bc	33.0 a	67.8 ab	1 : 0.95	3.39 c
T8, pumpkin	15 : 100	45.0 a	31.6 a	76.6 a	1 : 0.70	2.55 c
CV (%)		21.2	24.69	14.6		27.7

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแตนเบียน *A. lopezi*

จากผลการทดลองการอยู่รอดของแตนเบียน *A. lopezi* ที่บรรจุอัตรา 20, 25, 30 และ 35 คู่/ขวด ที่ระดับอุณหภูมิ 10°C พบว่ามีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 75 ที่ระยะเวลา 24.4, 23.4, 25.4 และ 26.2 วัน ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติ พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 41.1, 38.6, 44.9 และ 53.7 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 25 ที่ระยะเวลา 53.0, 53.0, 58.4 และ 61.2 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าแตนเบียน

ตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 61.6, 62.2, 67.6 และ 70.5 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 3)

จากผลการทดลองการอยู่รอดของแตนเบียน *A. lopezi* ที่บรรจุอัตรา 20, 25, 30 และ 35 คู่/ขวด ที่ระดับอุณหภูมิ 15°C พบว่ามีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 75 ที่ระยะเวลา 33.4, 33.4, 45.0 และ 44.2 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 50.6, 56.2, 57.5 และ 57.5 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 25 ที่ระยะเวลา 58.1, 62.3, 64.5 และ 65.2 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง และพบว่าแตนเบียนตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 65.8, 70.3, 72.2 และ 73.5 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4)

จากผลการทดลองการอยู่รอดของแตนเบียน *A. lopezi* ที่บรรจุอัตรา 20, 25, 30 และ 35 คู่/ขวด ที่ระดับอุณหภูมิ 20°C พบว่ามีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 75 ที่ระยะเวลา 14.1, 13.1, 17.3 และ 16.1 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 23.0, 23.0, 23.8 และ 22.6 วัน ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างทางสถิติ พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 25 ที่ระยะเวลา 29.9, 29.4, 31.0 และ 27.3 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าแตนเบียนตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 46.5, 43.8, 48.4 และ 47.7 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5)

จากผลการทดลองการอยู่รอดของแตนเบียน *A. lopezi* ที่บรรจุอัตรา 20, 25, 30 และ 35 คู่/ขวด ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C พบว่ามีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 75 ที่ระยะเวลา 11.3, 17.5, 11.6 และ 12.9 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 50 ที่ระยะเวลา 19.3, 23.7, 19.4 และ 20.9 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ พบอัตราการอยู่รอดร้อยละ 25 ที่ระยะเวลา 24.8, 27.5, 25.5 และ 27.3 วัน ตามลำดับ โดยแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าแตนเบียนตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 33.4, 34.3, 33.6 และ 34.1 วัน ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองการอยู่รอดของแตนเบียน *A. lopezi* ที่บรรจุอัตรา 20, 25, 30 และ 35 คู่/ขวด ที่ระดับอุณหภูมิ 30°C พบว่าแตนเบียนตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 11.9, 11.6, 12.2 และ 12.2 วัน ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 7)

Table 3 Comparison of survival of the parasitoids were stored at 10°C.

Treatment	Number of days that parasitoids can survive			
(Pairs)	75%	50%	25%	0%
20	24.4 a	41.1 bc	53.0 b	61.6 c
25	23.4 a	38.6 c	53.0 b	62.2 c
30	25.4 a	44.9 b	58.4 a	67.6 b
35	26.2 a	53.7 a	61.2 a	70.5 a
CV (%)	14.2	12.6	6.2	4.6

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

Table 4 Comparison of survival of the parasitoids were stored at 15°C.

Treatment	Number of days that parasitoids can survive			
(Pairs)	75%	50%	25%	0%
20	33.4 c	50.6 b	58.1 c	65.8 c
25	33.4 c	56.2 a	62.3 b	70.3 b
30	45.0 a	57.5 a	64.5 ab	72.2 ab
35	44.2 ab	57.5 a	65.2 a	73.5 a
CV (%)	16.5	6.4	4.2	4.2

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

Table 5 Comparison of survival of the parasitoids were stored at 20°C.

Treatment	Number of days that parasitoids can survive			
(Pairs)	75%	50%	25%	0%
20	14.1 bc	23.0 a	29.9 ab	46.5 ab
25	13.1 c	23.0 a	29.4 ab	43.8 b
30	17.3 a	23.8 a	31.0 a	48.4 a
35	16.1 ab	22.6 a	27.3 b	47.7 a
CV (%)	15.5	10.5	11.3	7.9

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

Table 6 Comparison of survival of the parasitoids were stored at 25°C.

Treatment	Number of days that parasitoids can survive			
(Pairs)	75%	50%	25%	0%
20	11.3 b	19.3 b	24.8 b	33.4 a
25	17.5 a	23.7 a	27.5 a	34.3 a
30	11.6 b	19.4 b	25.5 ab	33.6 a
35	12.9 b	20.9 b	27.3 a	34.1 a
CV (%)	31.4	13.6	9.4	3.9

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

Table 7 Comparison of survival of the parasitoids were stored at 30°C.

Treatment	Number of days that parasitoids can survive			
(Pairs)	75%	50%	25%	0%
20	-	-	-	11.9 a
25	-	-	-	11.6 a
30	-	-	-	12.2 a
35	-	-	-	12.2 a
CV (%)	-	-	-	12.2

In a column, mean followed by the same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

การทดลอง 5.2 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายมวนเพชฌฆาตเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช
ผลการทดลอง

การจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกเป็นขั้นตอน เพื่อเป็นเหยื่ออาหารสำหรับนำไปผลิตมวนเพชฌฆาตเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร สำหรับเป็นต้นแบบในการผลิตขยาย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ระยะการเจริญเติบโตของหนอนนก อัตราการตายของหนอน อัตราการตายของดักแด้ และความสามารถในการขยายพันธุ์ของหนอนนก

ผลการศึกษาพบว่าหนอนนกมีระยะไข่, ระยะหนอน และระยะดักแด้ มีอายุเฉลี่ย 10.0 $\pm$ 1.7 (8 – 12 วัน), 107.6 $\pm$ 19.2 (57 - 139 วัน) และ 7.52 $\pm$ 0.8 (6 - 10 วัน) วันตามลำดับ ระยะไข่-หนอนมีอายุเฉลี่ย 112.8 $\pm$ 21.7 วัน ระยะหนอนและดักแด้มีจำนวนการตายเฉลี่ย 2.0 $\pm$ 0.5 และ 5.2 $\pm$ 2.5% ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เมื่อเลี้ยงตัวเต็มวัยโดยไม่ใส่สำลีชุบน้ำและใส่สำลีชุบน้ำพอหมาดลงในกล่องเลี้ยงตัวเต็มวัยทำให้ระยะตัวเต็มวัยของหนอนนกมีอายุเฉลี่ยต่างกันคือ 31.1 $\pm$ 10.1 (24 - 38 วัน) และ 69.2 $\pm$ 16.7วัน (36 - 90 วัน) ตามลำดับ และสามารถวางไข่ได้เฉลี่ยต่างกันคือ 18.7 $\pm$ 2.4 และ 123.0 $\pm$ 31.4 ฟองต่อตัวเมีย 1 ตัว ตามลำดับ และตลอดชีวิต (ไข่-ตัวเต็มวัยตาย) ของหนอนนกมีอายุเฉลี่ย 151.4 $\pm$ 18.4 และ 188.0 $\pm$ 25.6 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ตัวเต็มวัยเริ่มวางไข่เมื่ออายุ 7 - 10 วัน มีระยะวางไข่นาน 55 - 60 วัน ไข่มีลักษณะเป็นรูปไข่สีขาวนวล เป็นฟองเดี่ยว หรือเป็นกลุ่มมีเศษอาหารปกคลุม ขนาดความยาว

หนอนที่เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำ(หนอนมีอายุ 70 วันเป็นต้นไป) คือ 2.6 ± 0.13 เซนติเมตร (2.4 - 2.8 เซนติเมตร) มีน้ำหนัก 0.114 กรัม/ตัว ดักแด้ที่มีขนาดใหญ่และสมบรูณ์มีน้ำหนัก 0.096 กรัมต่อตัว หรือ ดักแด้หนัก 1000 กรัม มีจำนวน 10,450 ตัว

ตารางที่ 1. ระยะการเจริญเติบโตของหนอนนกเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารไก่ ที่อุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ปี 2555

วัยต่างๆของหนอนนก	ระยะเวลาการเจริญเติบโต (วัน)	
	ให้สำลีชุบน้ำ	ไม่ให้สำลีชุบน้ำ
ระยะไข่		10.0 ± 1.7
ระยะหนอน		107.6 ± 19.2
ระยะดักแด้		7.52 ± 0.8
ระยะตัวเต็มวัย	69.2 ± 16.7	31.1 ± 10.1
ไข่ – หนอน		112.8 ± 21.7
ไข่ - ตัวเต็มวัยตาย	188.0 ± 25.6	151.4 ± 18.4
จำนวนหนอนตาย (%)		2.0 ± 0.5
จำนวนดักแด้ตาย(%)		5.2 ± 2.5
จำนวนไข่ (ฟอง) ต่อเพศเมีย 1 ตัว	123.0 ± 31.4	18.7 ± 2.4

2. จัดรูปแบบการผลิตขยายหนอนนกเหยื่ออาหารของมวนเพชฌฆาต ด้วยขั้นตอนต่างๆที่เหมาะสม

2.1 รูปแบบการผลิตขยายหนอนนกต่อหน่วย (ถาดขนาด 28x42 เซนติเมตร) ด้วยอาหารไก่ใหญ่ โดยการเลี้ยงตัวเต็มวัยแบบไม่ให้น้ำ มีขั้นตอนดังนี้

1) เริ่มจากนำดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว/ชุด ใส่ลงในถาดพลาสติก 1 ถาด ซึ่งในระยะนี้มีการตายเฉลี่ย 5.2 % และดักแด้มีอายุ 8 วัน จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

2) โรยอาหารไก่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลงหนัก 40 กรัม ลงในถาดเพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัย ตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 7 - 10 วัน จะเริ่มวางไข่

3) ไข่ถูกวางติดบนพื้นถาดโดยมีเศษอาหารปกคลุม ใช้ตะกร้าร่อนตัวเต็มวัยออกจากอาหาร นำตัวเต็มวัยใส่ลงถาดใบใหม่เติมอาหารไก่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลง หนัก 40 กรัม/ถาด/การเก็บไข่ 1 ครั้ง

4) ส่วนอาหารทั้งหมดที่ร่อนออกมานำกลับมาใส่ในถาดไข่ดังเดิมเพื่อนำมาเลี้ยงเป็นตัวหนอนต่อไป สำหรับการเลี้ยงตัวเต็มวัยแบบไม่ให้น้ำ ตลอดอายุตัวเต็มวัยจะเก็บไข่ทั้งหมด 2 ครั้ง ทุก 20 วัน/ครั้ง เริ่มจากตัวเต็มวัยฟัก ตัวเต็มวัยมีอายุเฉลี่ย 31 วัน (28 - 40 วัน) ไข่ใช้เวลา 10 วัน จะฟักเป็นตัวหนอน

5) หนอนนกตั้งแต่วัย 1 - 13 มีอายุนาน 107 วัน เลี้ยงด้วยอาหารไก่ เมื่ออาหารในถาดถูกกินจนป่นจะเติมอาหารอีกประมาณ 660 กรัม/ถาด ซึ่งจะมีหนอนนกทั้งหมด 2 ถาด เมื่อหนอนนกลอกคราบครั้งสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นดักแด้ อาหารจะถูกกินจนป่นเกือบหมด ระยะหนอนมีการตายเฉลี่ย 2 %

6) ระยะตัวเต็มวัยและหนอนใช้อาหารทั้งหมด 1,400 กรัม / 2 ถาด จำนวนดักแด้ที่ผลิตได้ทั้งหมดเฉลี่ย 3,452 ตัว / 2 ถาด ใช้ต้นทุนค่าอาหารทั้งหมดในการผลิต 19.6 บาท ดักแด้ที่ผลิตได้มีน้ำหนัก 330 กรัม และหนอนนกที่มีขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำที่ผลิตได้มีน้ำหนัก 394 กรัม

ราคาหนอนนกและอาหารไก่ที่ซื้อมาจากสวนจตุจักร : หนอนนกราคา 23 - 30 บาท/100 กรัม หรือ 180 บาท/กิโลกรัม และอาหารไก่ 1 กระสอบ (30,000 กรัม) ราคา 420 บาท

7) เก็บดักแด้ใส่ถาดใบใหม่นำไปเลี้ยงต่อไป และนำถาดเลี้ยงเดิมไปล้างทำความสะอาดตากแดด

8) การทำความสะอาดถาดเลี้ยงหนอนตั้งแต่วัย 1 โดยใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และใช้ตะแกรงร่อนเศษอาหารที่ป่นและมูลหนอนออกทิ้ง ทุก 30 วัน จนถึงหนอนอายุ 90 วัน และหลังจากนี้ทุก 10 วัน จะใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมาเพื่อสะดวกในการเก็บดักแด้

สรุปการผลิตหนอนนกต่อหน่วย (ถาด) แบบไม่ให้น้ำแก่ตัวเต็มวัย โดยเริ่มจากดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว/ถาด สามารถผลิตดักแด้ได้ทั้งหมด 3,452 ตัว (330 กรัม) / 2 ถาด ใช้อาหารไก่เลี้ยงทั้งหมดหนัก 1,400 กรัม / 2 ถาด ใช้ต้นทุนค่าอาหารทั้งหมดในการผลิต 19.6 บาท / 2 ถาด ใช้เวลาในการเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 151 วัน

2.2 รูปแบบการผลิตขยายหนอนนกต่อหน่วย (ถาดขนาด 28x42 เซนติเมตร) ด้วยอาหารไก่ใหญ่ โดยการเลี้ยงตัวเต็มวัยแบบให้น้ำ เพื่อให้น้ำและความชื้นแก่ตัวเต็มวัยหนอนนก มีขั้นตอนดังนี้

1) เริ่มจากนำดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว ใส่ลงในถาดพลาสติก 1 ถาด/ชุด/สัปดาห์ ซึ่งในระยะนี้มีการตายเฉลี่ย 5.2 % และดักแด้มีอายุ 8 วัน จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

2) โรยอาหารไก่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลงหนัก 40 กรัม ลงในถาดเพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัย พร้อมใส่สำลีหรือผ้ายืดหรือผ้าสำลีขนาด 4x4 ตารางนิ้ว ชุบน้ำพอหมาดลงบนเพลทพลาสติกวางบนพื้นถาด และนำสำลีหรือผ้ายืดหรือผ้าสำลีในถาดมาชุบน้ำพอหมาดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ตัวเต็มวัยอายุประมาณ 7 - 10 วัน จะเริ่มวางไข่

3) ไข่ถูกวางติดบนพื้นถาดโดยมีเศษอาหารปกคลุม หลังจากเป็นตัวเต็มวัยได้ 15 วัน ใช้ตะกร้าร่อนตัวเต็มวัยออกจากอาหาร นำตัวเต็มวัยใส่ลงถาดใบใหม่เติมอาหารไก่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลง หนัก 40 กรัม/ถาด/การเก็บไข่ 1 ครั้ง พร้อมสำลีหรือเศษผ้ายืดหรือผ้าสำลีชุบน้ำพอหมาด

4) ส่วนอาหารทั้งหมดที่ร่อนออกมานำกลับมาใส่ในถาดไข่ดังเดิมเพื่อนำมาเลี้ยงต่อไป สำหรับการเลี้ยงตัวเต็มวัยแบบให้น้ำนั้น ตลอดอายุตัวเต็มวัยจะเก็บไข่ทั้งหมด 4 ครั้ง เริ่มจากตัวเต็มวัยฟักโดย 3 ครั้งแรกทำทุก 15 วัน/ครั้ง และทิ้งไว้ 25 วัน จะเก็บไข่ครั้งที่ 4 มีระยะวางไข่นาน 55 - 60 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุเฉลี่ย 68 วัน (59 - 92 วัน) ไข่ใช้เวลา 10 วัน จะฟักเป็นตัวหนอน

5) หนอนนกตั้งแต่วัย 1 - 13 มีอายุนาน 107 วัน เลี้ยงด้วยอาหารไก่ เมื่ออาหารในถาดถูกกินจนป่นจะเติมอาหารอีกครั้งละ 500 กรัม/ถาด ประมาณ 2 – 3 ครั้ง/ถาด เมื่อหนอนนกลอกคราบครั้งสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นดักแด้ อาหารจะถูกกินจนป่นเกือบหมด ระยะหนอนมีการตายเฉลี่ย 2 %

6) ระยะตัวเต็มวัยและหนอนใช้อาหารทั้งหมด 5,670 กรัม/4 ถาด จำนวนดักแด้ที่ผลิตได้ทั้งหมดเฉลี่ย 13,976 ตัว/4 ถาด ใช้ต้นทุนค่าอาหารทั้งหมดในการผลิต 79.4 บาท ดักแด้ที่ผลิตได้มีน้ำหนัก 1337.42 กรัม และหนอนนกขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำที่ผลิตได้มีน้ำหนัก 1593.26 กรัม

ราคาหนอนนกและอาหารไก่ที่ซื้อมาจากสวนจตุจักร : หนอนนกราคา 23 - 30 บาท/100 กรัม และอาหารไก่ 1 กระสอบ (30,000 กรัม) ราคา 420 บาท

7) เก็บดักแด้ที่ได้ใส่ถาดใบใหม่นำไปเลี้ยงต่อไปตามขั้นตอนที่ 1 และนำถาดเลี้ยงเดิมไปล้างทำความสะอาดตากแดด

8) ดักแด้บางส่วนที่ยังไม่ต้องการเลี้ยงต่อ นำมาใส่ในกล่องพลาสติกที่ปูด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์โรยดักแด้กระจายให้ทั่ว ปิดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ นำไปเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 สัปดาห์ เมื่อนำดักแด้ออกจากตู้เย็นทิ้งไว้นาน 4 – 7 วัน ดักแด้จะฟักเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ทุกตัว และมีประสิทธิภาพในการผลิตหนอนคงเดิม

9) การทำความสะอาดถาดเลี้ยงหนอนตั้งแต่วัย 1 โดยใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และใช้ตะแกรงร่อนเศษอาหารที่ป่นและมูลหนอนออกทิ้ง ทุก 30 วัน จนถึงหนอนอายุ 90 วัน และหลังจากนี้ทุก 10 วัน จะใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมาเพื่อสะดวกในการเก็บดักแด้

10) เริ่มดำเนินการผลิตตามขั้นตอนที่ 1 ด้วยดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว/ถาด/ชุด/สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นอาหารผลิตขยายมวนเพชฌฆาต 1 ชุด จำนวน 10,000 ตัว/สัปดาห์

สรุปการผลิตหนอนนกต่อหน่วย (ถาด) แบบให้น้ำแก่ตัวเต็มวัย โดยเริ่มดำเนินการทุกสัปดาห์จากดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว/ถาด/ชุด/สัปดาห์ สามารถผลิตหนอนนกขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำ (หนอนนกมีอายุ 70 วันเป็นต้นไป) ได้ทั้งหมด 13,976 ตัว หรือ 1593.26 กรัม/ชุด/สัปดาห์ ถ้าเลี้ยงต่อไปเป็นดักแด้สามารถผลิตดักแด้ได้ทั้งหมด 1337.42 กรัม/ชุด/สัปดาห์ ใช้อาหารไก่ใหญ่เลี้ยงทั้งหมดหนัก 5,670 กรัม/ชุด/สัปดาห์ ใช้ต้นทุนค่าอาหารทั้งหมดในการผลิต 79.4 บาท/ชุด/สัปดาห์ ใช้เวลาในการเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 188 วัน/ชุด

การทดลอง 5.3 ต้นแบบการผลิตขยายไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก

ผลการทดลอง

วิธีการผลิตไรตัวห้ำให้ได้เป็นปริมาณมาก 3 ชนิด ได้แก่ *Amblyseius longispinosus*, *A. californicus* และ *A. cinctus* ดังมีรายละเอียด ดังนี้

การผลิตไรตัวห้ำ *Amblyseius longispinosus* (Evans)

เหยื่อที่เหมาะสมที่สุดในการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. longispinosus* คือ ไรแดงหม่อน (*Tetranychus truncatus* Ehara) การผลิตไรตัวห้ำแบ่งเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ไรอาหาร (ไรแดงหม่อน)

วิธีการผลิตไรตัวห้ำเป็นจำนวนมากอย่างต่อเนื่อง ต้องทำการเก็บรักษาพ่อ-แม่พันธุ์ทั้งไรแดงหม่อนและไรตัวห้ำไว้ในปริมาณที่พอเหมาะ เพื่อใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ตั้งต้นสำหรับนำไปผลิตเป็นปริมาณมากในโรงเรือน จำนวนพ่อ-แม่พันธุ์ที่จะเก็บรักษาไว้นั้นขึ้นอยู่กับแรงงานของผู้ดูแล ในส่วนนี้ควรทำการเพาะเลี้ยงในห้องปรับอากาศอุณหภูมิประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส ปิดมิดชิดเพื่อป้องกันไม่ให้มีไรตัวห้ำเล็ดลอดเข้าไปในบริเวณที่เลี้ยงไรแดงหม่อนที่ใช้เป็นอาหาร

อุปกรณ์ มีดังนี้

- ใบหม่อน หม่อนพันธุ์ที่เหมาะสม คือ พันธุ์บุรีรัมย์ 60 (ภาพที่ 1)
- ถาดพลาสติกขนาด 30 x 35 เซนติเมตร
- สำลี
- พู่กันเบอร์ศูนย์
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- แว่นขยาย 10 เท่า
- ชั้นติดตั้งหลอดฟลูออเรสเซนส์
- ห้องปรับอากาศ

วิธีการ มีดังนี้

1. เก็บไรแดงหม่อนจากธรรมชาติที่พบบนต้นหม่อน ถั่วฝักยาว หรือมันสำปะหลัง นำมาเพาะเลี้ยงบนใบหม่อนที่ไม่อ่อนและแก่จนเกินไป (อายุประมาณ 2-3 สัปดาห์) ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 27-28 องศาเซลเซียส หากไม่มีห้องปรับอากาศสามารถเพาะเลี้ยงในห้องอุณหภูมิปกติที่ไม่ร้อนมากได้ แต่การเพาะเลี้ยงในห้องปรับอากาศใบหม่อนที่ใช้เป็นพืชอาศัยจะมีอายุยืนยาวกว่า

2. ใช้พู่กันเขี่ยไรแดงหม่อนเพศเมียและเพศผู้ ประมาณ 20 - 30 คู่ วางบนใบหม่อนด้านใต้ใบ การเขี่ยไรควรทำใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ถ้าไม่มีกล้องจุลทรรศน์อาจทำการเขี่ยไรใต้แว่นขยาย จากนั้นวางใบหม่อนหงายใบบนสำลีซึ่งอยู่ในถาดพลาสติก (ภาพที่ 2) หล่อน้ำให้ท่วมสำลีเพื่อให้ใบหม่อนสดอยู่ได้เป็นเวลานาน และทำให้ไรแดงหม่อนที่อาศัยอยู่บนใบไม่สามารถเดินหนีออกจากใบได้

3. นำถาดวางบนชั้นที่ใช้หลอดฟลูออเรสเซนส์ให้ได้รับแสงนาน 9 ชั่วโมงต่อวัน ปล่อยให้ไรแดงหม่อนเจริญพันธุ์ขยายประชากรจนใบหม่อนเริ่มเหี่ยว ทำการขยายไรแดงหม่อนต่อไป โดยตัดใบหม่อนที่เหี่ยวแล้วเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปวางบนใบใหม่ ซึ่งใบเก่า 1 ใบ สามารถขยายต่อไปยังใบใหม่ได้ 3 - 4 ใบ (ภาพที่ 3)

ขั้นตอนที่ 2 การเพาะเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำ *A. longispinosus*

วิธีการ

ไรตัวห้ำ *A. longispinosus* ที่ใช้เป็นพ่อ-แม่พันธุ์ สามารถขอได้จากกลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อสายพันธุ์พ่อ-แม่พันธุ์ในห้องปรับอากาศเช่นเดียวกับการเลี้ยงไรแดงหม่อน ดังนี้

1. เขี่ยไรตัวห้ำเพศเมียและเพศผู้ลงบนใบหม่อนที่เลี้ยงไรแดงหม่อนอยู่อย่างหนาแน่นเต็มใบแล้ว ประมาณ 10-20 คู่ เพื่อให้ไรตัวห้ำกินไรแดงหม่อนขยายพันธุ์เพิ่มมากขึ้น

2. นำถาดเลี้ยงวางบนชั้นที่ใช้หลอดฟลูออเรสเซนส์ให้แสงนาน 9 ชั่วโมงต่อวัน ไรตัวห้ำสามารถขยายจำนวนประชากรได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนไรแดงหม่อนและสภาพใบหม่อน ถ้าไรแดงหม่อนมีปริมาณมากและใบหม่อนมีสภาพแข็งแรง มีความสด ไม่เหี่ยวเฉา ไรตัวห้ำจะสามารถขยายพันธุ์ได้มากขึ้นด้วย วิธีการย้ายไรตัวห้ำจากใบหม่อนที่เหยื่อหมดแล้วหรือเหี่ยวแห้งไปยังใบหม่อนใบใหม่ ให้ใช้วิธีการตัดใบเก่าที่มีไรตัวห้ำอยู่เต็มแล้วไปวางทาบบนใบหม่อนสดใหม่ที่มีไรแดงหม่อนอยู่เต็ม ให้ไรตัวห้ำเดินย้ายลงไปกินอาหารบนใบใหม่เอง ซึ่งใบเก่า 1 ใบ สามารถขยายต่อไปยังใบใหม่ได้ 3-4 ใบ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณไรตัวห้ำและไรอาหารบนใบหม่อนนั้น ๆ

ข้อควรระวัง ในการเพาะเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ไรแดงหม่อน และพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำ

1. ห้องเลี้ยงไรอาหาร (ไรแดงหม่อน) ต้องอยู่แยกจากห้องเลี้ยงไรตัวห้ำ ผู้เลี้ยงต้องระมัดระวังไม่ให้ไรตัวห้ำติดภาชนะ หรือเสื้อผ้า ผู้ดูแลควรทำงานในห้องเลี้ยงไรแดงหม่อนก่อนเข้าทำงานในห้องเลี้ยงไรตัวห้ำ ทั้งนี้เพื่อป้องกันไม่ให้ไรตัวห้ำปะปนเข้าไปกินพ่อ-แม่พันธุ์ไรแดงหม่อน ซึ่งไรสามารถติดไปกับเสื้อผ้า และเครื่องมือที่ใช้ในห้องปฏิบัติการได้ ทุกครั้งที่ปฏิบัติการต้องมีการล้างมือและอุปกรณ์ให้สะอาด

2. ควรเก็บรักษาไรแดงหม่อน และไรตัวห้ำพ่อ-แม่พันธุ์ให้อยู่ในปริมาณที่ผู้เลี้ยงสามารถดูแลได้อย่างทั่วถึง หากมีไรพ่อ-แม่พันธุ์มากเกินไป การปนเปื้อนอาจจะเกิดขึ้นได้ง่าย

ขั้นตอนที่ 3 การเลี้ยงขยายไรแดงหม่อนและไรตัวห้ำให้ได้ปริมาณมากบนต้นถั่ว

ส่วนนี้ทำการเพาะเลี้ยงบนพืชอาศัยในโรงเรือน พืชอาศัยที่ไรแดงหม่อนสามารถเพิ่มปริมาณประชากรได้รวดเร็วที่สุด คือ ถั่วในตระกูล *Vigna* spp. วงศ์ Fabaceae ได้แก่ ถั่วพุ่ม (cowpea, *Vigna unguiculata* (L.)) และถั่วเขียว (Mung bean, *V. radiate* (L.)) (Kongchuensin *et al*., 2006) นอกจากนั้น ถั่วที่ใช้เป็นพืชอาศัยได้ดีใกล้เคียงกับถั่วพุ่มและถั่วเขียว ได้แก่ ถั่วดำ (Black seeded race,

V. sinensis (L.)) ขนาดของโรงเรือนขึ้นอยู่กับความต้องการจำนวนไรตัวห้ำ โรงเรือนมุงด้วยตาข่ายถี่ มีหลังคากันฝนเป็นพลาสติกใสให้ได้รับแสงแดดเต็มที่ เพื่อให้ต้นถั่วเจริญเติบโตดี ซึ่งมีผลทำให้ไรแดงหม่อนขยายพันธุ์ได้มากและรวดเร็ว

อุปกรณ์ มีดังนี้

- ต้นถั่วดำ
- ถุงเพาะชำขนาด กว้าง x ยาว เท่ากับ 22 x 42 เซนติเมตร
- ตะกร้าพลาสติกขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 38 x 55 x 30 เซนติเมตร
- สำลี
- พู่กันเบอร์ 0
- แว่นขยาย
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- โรงเรือน 2 โรง ได้แก่ โรงเรือนเลี้ยงไรอาหาร (ไรแดงหม่อน) และโรงเรือนเลี้ยงไรตัวห้ำ ลักษณะเป็นโรงเรือนหลังคาใส มุงตาข่ายด้านข้างขนาดความถี่ 32 ช่อง (32 Mesh) ขนาด กว้าง x ยาว xสูง เท่ากับ 4 x 6 x 3.5 เมตร มีจั่ว 2 ชั้น เพื่อระบายอากาศ (ภาพที่ 4) ขนาดของโรงเรือนดังกล่าวนี้สามารถปรับได้ให้เหมาะสมกับพื้นที่และปริมาณไรตัวห้ำที่ต้องการผลิตได้

วิธีการ มีดังนี้

1. เพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนบนต้นถั่วดำ หรือถั่วพุ่ม ในโรงเรือน มุงตาข่ายด้านข้างเพื่อป้องกันแมลงศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ (ภาพที่ 4) โดยปลูกต้นถั่วในถุงเพาะชำใส่ในตะกร้าๆ ละ 6 ถุง ถุงละประมาณ 30 ต้น (ภาพที่ 5) วางในตะกร้าพลาสติกบนขาตั้งและหล่อน้ำเพื่อป้องกันมดซึ่งเป็นศัตรูที่สำคัญของไรแดงหม่อน (ภาพที่ 6) การเพาะปลูกถั่วในตะกร้าทำให้สะดวกในการเคลื่อนย้ายต้นถั่วและดูแลรักษา หรืออาจใช้วิธีปลูกต้นถั่วในกระถางขนาด 6-8 นิ้วแทนถุงเพาะชำได้ ใส่ปุ๋ยยูเรียและปุ๋ยวิทยาศาสตร์สูตร 16-16-16 บำรุงให้ต้นถั่วแข็งแรง เมื่อต้นถั่วเริ่มงอกให้ใบแท้ชุดแรก (อายุประมาณ 1 สัปดาห์) ให้พ่นสารฆ่าแมลงพ่นเพื่อป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟและหนอนชอนใบที่อาจจะเล็ดลอดผ่านมุ้งตาข่ายเข้ามาทำลายใบถั่ว สารฆ่าแมลงที่ตกค้างบนต้นถั่ว แต่ไม่เป็นอันตรายต่อไรแดงหม่อน ได้แก่ อิมิดาคลอพริด (imidacloprid 10% SL) อัตรา 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร

2. เมื่อถั่วอายุประมาณ 2 สัปดาห์ นำพ่อ-แม่พันธุ์ไรแดงหม่อนที่เพาะเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการมาปล่อยบนต้นถั่วเพื่อให้ขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนประชากร อัตราการปล่อยประมาณ 700 – 800 ตัวต่อตะกร้า วิธีการปล่อยให้ใช้แว่นขยายนับไรแดงหม่อนพ่อ-แม่พันธุ์บนใบหม่อนอย่างคร่าว ๆ ให้ได้ 700 - 800 ตัว จากนั้นตัดแบ่งใบหม่อนเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางทาบลงบนใบถั่วให้กระจายทั่วตะกร้า (ภาพที่ 7)

3. ปล่อยให้ไรแดงหม่อนขยายพันธุ์เพิ่มประชากรตามธรรมชาติบนต้นถั่วนานประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ จะสังเกตุได้ว่าไรแดงหม่อนดูดกินอยู่ใต้ใบถั่วแล้วขยายพันธุ์มากขึ้นจนทำให้ใบถั่วเป็นจุดประเหลืองซีด (ภาพที่ 8) พร้อมที่จะนำไปใช้เป็นอาหารเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำต่อไป

ขั้นตอนที่ 4 การเลี้ยงขยายไรตัวห้ำให้ได้ปริมาณมากบนต้นถั่ว

ทำการเลี้ยงในโรงเรือนเพาะไรตัวห้ำ ซึ่งต้องแยกให้อยู่ห่างจากโรงเรือนเพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนให้มากที่สุด ทั้งนี้เพื่อป้องกันมิให้ไรตัวห้ำปะปนเข้าไปในโรงเรือนเพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนและกินไรแดงหม่อนก่อนที่ไรแดงหม่อนจะเพิ่มประชากรได้เป็นปริมาณมาก ซึ่งจะทำให้ระบบการผลิตไรตัวห้ำอย่างต่อเนื่องเสียหายได้

วิธีการ มีดังนี้

1. ย้ายต้นถั่วที่เพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนไว้แล้วนาน 2 สัปดาห์ (ต้นถั่วมีอายุประมาณ 3 - 4 สัปดาห์) จนมีไรแดงหม่อนหนาแน่นบนใบถั่ว เข้าไปไว้ในโรงเรือนเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ

2. นำพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำสุ่มปล่อยกระจายลงบนต้นถั่วให้ทั่วตะกร้า ประมาณ 25 - 50 ตัวต่อตะกร้า (ภาพที่ 9) สำหรับอัตราไรตัวห้ำ : ไรแดงหม่อน (อาหาร) ที่เหมาะสมในการเริ่มต้นเพาะเลี้ยง คือ 1:20 – 1:40 ซึ่งผู้เลี้ยงสามารถคำนวนอัตราการปล่อยพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำให้เหมาะสมได้จากปริมาณไรแดงหม่อนที่ย้ายเข้ามาเป็นอาหาร หากไรแดงหม่อนมีปริมาณมากหนาแน่นบนต้นถั่ว ก็ปล่อยพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำให้มาก แต่หากมีไรแดงหม่อนน้อยก็ปล่อยพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำให้น้อย

3. จากนั้นปล่อยให้ไรตัวห้ำกินไรแดงหม่อนขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณมากบนต้นถั่วเป็นระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ หรือจนกระทั่งไรแดงหม่อนที่เป็นอาหารบนต้นถั่วหมด ซึ่งพบว่าต้นถั่วอาจเริ่มเหี่ยวแห้ง (ภาพที่ 10)

4. ช่วงเวลาการเก็บเกี่ยวไรตัวห้ำที่เหมาะสม ควรเป็นระยะที่สังเกตุเห็นว่าไรแดงหม่อนบนใบถั่วเกือบหมดพอดี ซึ่งหากเก็บเกี่ยวช้าเกินไปเมื่อไรตัวห้ำไม่มีอาหารกินไรตัวห้ำจะย้ายหนีออกจากใบถั่วอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่สามารถเก็บเกี่ยวไรตัวห้ำได้ทัน

5. จำนวนไรตัวห้ำที่เก็บเกี่ยวได้ในเวลาเหมาะสมจะได้ประมาณ 100 เท่าของปริมาณพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำที่เริ่มต้นผลิต

ขั้นตอนที่ 5 การเก็บเกี่ยวไรตัวห้ำ

วิธีการ มีดังนี้

1. ใช้วิธีตัดใบถั่วที่มีไรตัวห้ำบรรจุลงกระบอกกระดาษ (ภาพที่ 11) ไม่ควรใส่มากเกินไปจนแน่น จากนั้นปิดฝากระบอกกระดาษ ใช้เทปพันให้แน่น พร้อมนำไปปล่อยในแปลงปลูก (ภาพที่ 12 และ 13) ซึ่งในรอบการผลิต 5 สัปดาห์ จะได้ไรตัวห้ำประมาณ 10 - 30 ตัวต่อใบ ทั้งนี้การผลิตไรตัวห้ำจะได้มากหรือน้อยขึ้นอยู่กับจำนวนไรอาหารและสภาพความสมบูรณ์ของต้นถั่ว

2. เก็บไรตัวห้ำที่บรรจุกระบอกกระดาษไว้ในห้องอุณหภูมิปกติ ไรตัวห้ำสามารถมีชีวิตในสภาพอดอาหารได้นานประมาณ 2 - 3 วัน แต่หากเก็บไว้ในห้องเย็นหรือตู้เย็นช่องธรรมดา (อุณหภูมิ 15 – 17 องศาเซลเซียส) จะสามารถยืดอายุไรตัวห้ำให้ยืนยาวมาก 4 - 5 วัน

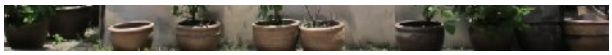
ขั้นตอนการผลิตไรตัวห้ำในสภาพภูมิอากาศของกรุงเทพฯ แสดงไว้ในภาพที่ 14

ภาพที 1 ต้นหม่อนพันธุ์บุรีรัมย์ 60

ภาพที 2 ถาดเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ไรแดงหม่อนบนใบหม่อน

ภาพที 3 ชั้นเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ไรแดงหม่อนให้แสงนาน 9 ชั่วโมงต่อวัน

ภาพที 4 โรงเรือนเพาะเลียงไรแดงหม่อน (ไรอาหาร)



ภาพที 5 ปลูกต้นถัวพุ่มในถุงเพาะชำใส่ในตะกร้า

ภาพที 6 ตะกร้าปลูกถัววางบนขาตังหล่อนำกันมด ในโรงเรือนมุงตาข่าย หลังคาพลาสติก

ภาพที่ 7 นำพ่อ-แม่พันธุ์ไรแดงหม่อนปล่อยเลี้ยงขยายบนต้นถั่วอายุ 2 สัปดาห์ โดยการวางทาบ ประมาณ 700 - 800 ตัวต่อตะกร้า

ภาพที่ 8 ต้นถั่วอายุประมาณ 4 สัปดาห์ ที่ไรแดงหม่อนขยายปริมาณมาก พร้อมจะย้ายไปโรงเรือนตัวหำ เพื่อปล่อยพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวหำ

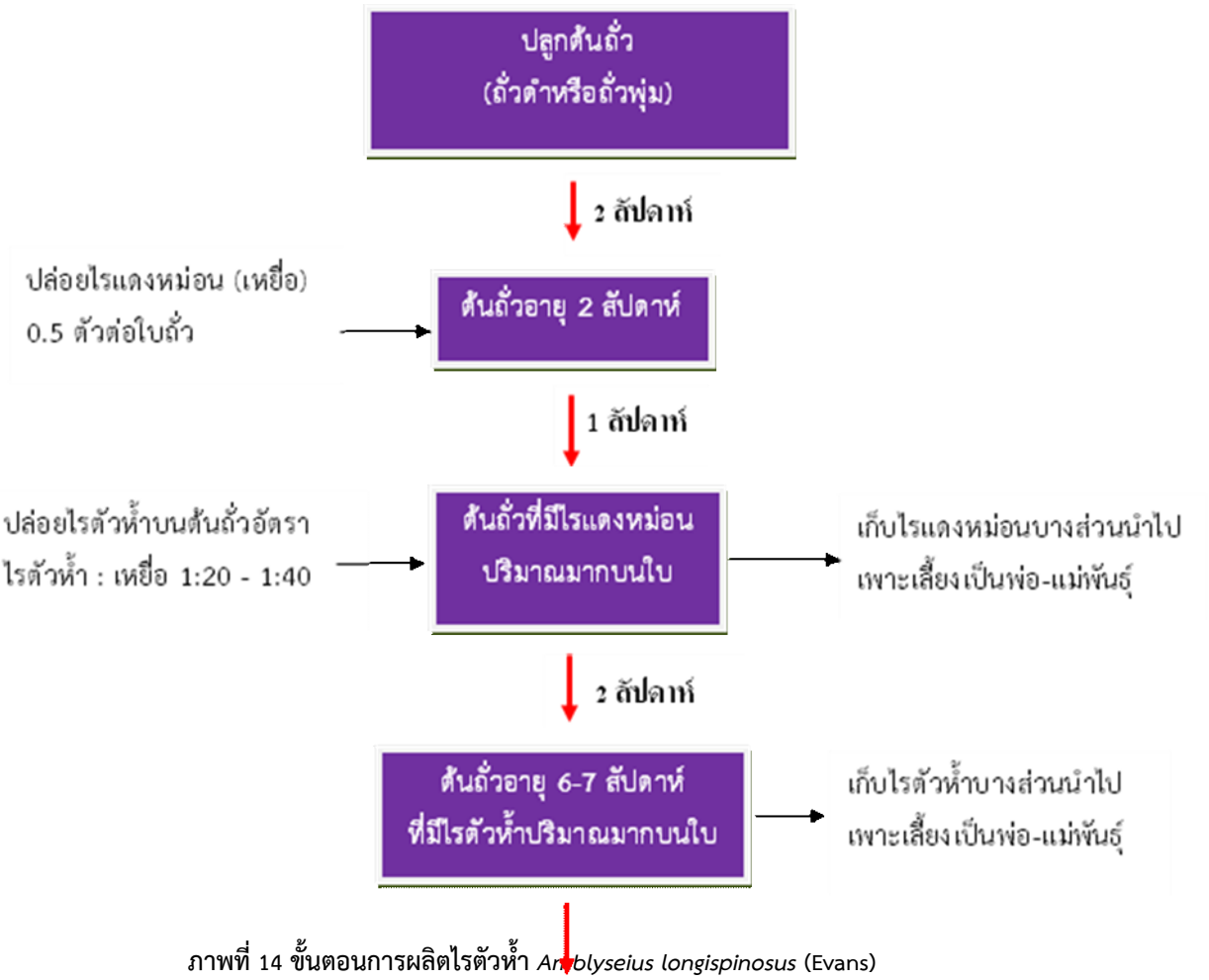
ภาพที่ 9 ปล่อยพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำลงบนต้นถั่วที่มีไรแดงหม่อนหนาแน่นแล้ว

ภาพที่ 10 ต้นถั่วที่ไรตัวห้ำขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณเป็นเวลา 2 สัปดาห์ และกินไรแดงหม่อนบนใบถั่วหมดแล้ว พร้อมเก็บเกี่ยว

ภาพที่ 4.11 ตัดใบถั่วเพื อ อีบเกียวไรตัวหำ

ภาพที่ 12 บรรจุใบถั่วที มีไรตัวหำลงกระบอกกระดาษ

ภาพที่ 13 กระบอกกระดาษบรรจุไรตัวหำปิดสนิท พร้อมนำไปปล่อยในแปลงปลูก



ภาพที่ 14 ขั้นตอนการผลิตไรตัวห้ำ *Amblyseius longispinosus* (Evans)
โดย

ต้นทุนการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ *A. longispinosus* ใน 1 รอบการผลิต

การผลิตไรตัวห้ำ *A. longispinosus* ได้ถ่ายทอดไปยังเกษตรกรให้ทำการเพาะเลี้ยงเองได้แล้ว โดยเกษตรกรได้ทำการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำในเขตจตุจักร กรุงเทพฯ (ภาพที่ 15, 16 และ 17) และเก็บเกี่ยวนำไปปล่อยในแปลงกุหลาบที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยเกษตรกรมีการปรับเปลี่ยนการเพาะเลี้ยงให้ง่าย เพื่อลดต้นทุน มีค่าใช้จ่ายดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการผลิตไรตัวห้ำของเกษตรกรในรอบ 1 เดือน

รายการ	**ค่าใช้จ่าย (บาท/เดือน)**
ต้นทุนการปลูกถั่วเพื่อเลี้ยงไรตัวห้ำ	
- ค่าถั่วเขียว ราคาถุงละ 27 บาท ใช้ได้นาน 4 เดือน ปลูก 8 ต้น/กระถาง จำนวน 200 กระถาง/เดือน	6.75
- ค่าเตรียมดิน เช่น ค่าดิน และ ปุ๋ย ราคา 1 บาท/ กระถาง	200
- ค่าไรแดงหม่อนอาหารของไรตัวห้ำ (เก็บมาเพาะเลี้ยงเอง)	-
- ค่าไรตัวห้ำ (เก็บมาเพาะเลี้ยงเอง)	-
ค่าแรง (ใช้คนงานประจำ 1 คน ที่มีอยู่แล้ว)	-
รวม	206.75 ---------- (A)
ใน 1 เดือน ปลูกต้นถั่วจำนวน	200 กระถาง
ต้นถั่ว 1 กระถาง ปลูกถั่วได้	8 ต้น
ใน 1 กระถาง ได้ต้นถั่วที่สมบูรณ์เพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ	30%
ต้นถั่ว 1 ต้น เก็บเกี่ยวใบถั่วที่มีไรตัวห้ำได้	9 - 12 ใบ
ใบถั่ว 1 ใบ มีจำนวนไรตัวห้ำประมาณ	25 – 30 ตัว
ดังนั้น เกษตรกรผลิตไรตัวห้ำได้ประมาณ	108,000 – 172,800 ตัว/เดือน--- (B)
ต้นทุนผลิตไรตัวห้ำ = (A/B)	**= 0.001 - 0.002** บาท/ไรตัวห้ำ 1 ตัว

หมายเหตุ ไม่รวมค่าจ้างคนงาน และค่าใช้จ่ายอุปกรณ์ที่มีการลงทุนเฉพาะครั้งแรกเพียงครั้งเดียว เช่น กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอขนาดพกพา (ราคาประมาณ 15,000 บาท) และห้องปรับอากาศที่มีอยู่แล้ว

ภาพที่ 15 เกษตรกรเพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนบนต้นถั่วเขียวในกระถาง

ภาพที่ 16 ใบถั่วที มีไรแดงหม่อนอาศัยอยู่เต็ม พร้อมย้ายนำไปปล่อยไรตัวหำ

ภาพที่ 17 เกษตรกรตรวจดูปริมาณไรตัวหำก่อนเก็บเกี่ยว

การผลิตไรตัวห้ำ *Amblyseius californicus* (McGregor)

ไรตัวห้ำ *A. californicus* เป็นไรตัวห้ำที่นำเข้ามาจากประเทศนิวซีแลนด์ (มานิตาและคณะ, 2543) มีวิธีการเพาะเลี้ยงเหมือนกับการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. longispinosus* กล่าวคือ ใช้ไรแดงหม่อนเป็นเหยื่อ และเลี้ยงบนต้นถั่วพุ่ม ถั่วดำ หรือถั่วเขียว มีระยะเวลาการเพาะเลี้ยงนานประมาณ 5 สัปดาห์ต่อการผลิต 1 รอบเช่นกัน

จากการส่งเสริมให้มีการใช้ไรตัวห้ำควบคุมไรศัตรูสตรอเบอรี่และกุหลาบในพื้นที่สูงของมูลนิธิโครงการหลวง การเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำจึงควรทำการผลิตในแหล่งปลูกพืชทั้งสองชนิดนี้บนที่พื้นที่สูง การทดสอบเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. californicus* ที่สถานีเกษตรหลวงอ่างขาง พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำชนิดนี้ได้ดี การเพาะเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ไรตัวห้ำ *A. californicus* สามารถเลี้ยงได้ในห้อง แต่ต้องกั้นพลาสติกคลุมชั้นวางถาดเลี้ยง หากอากาศมีความหนาวเย็นเกินไป ส่วนการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ *A. californicus* เป็นปริมาณมาก ใช้วิธีเดียวกันกับการเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. longispinosus* โดยทำการเพาะเลี้ยงบนต้นถั่วดำที่ปลูกในกระถาง 6 x 8 นิ้ว (ภาพที่ 18 และ 19) โดยมีการผลิตตามต้นแบบการผลิตในสภาพอากาศของกรุงเทพ ฯ

นอกจากนั้น การทดสอบผลิตไรตัวห้ำ *A. californicus* เป็นปริมาณมากบนพื้นที่สูงที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย จังหวัดเชียงใหม่ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน-มีนาคม ซึ่งมีสภาพอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 20, 21 และ 22) ด้วยระบบการปลูกถั่วแบบไฮโดรโพนิกส์ในโรงเรือน แทนการปลูกถั่วโดยใช้ดิน ผลการทดลอง (มานิตาและคณะ, 2550) พบว่า

1. เหยื่อที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้เพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ คือ ไรสองจุด (*Tetranychus urticae* Koch) ไม่สามารถใช้ไรแดงหม่อนเป็นเหยื่อได้ เนื่องจากไรแดงหม่อนเจริญเติบโตได้ช้าในพื้นที่สูงและมีสภาพอากาศเย็น

2. พืชอาศัยที่ดีที่สุดสำหรับเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำในพื้นที่สูงที่มีอากาศเย็น ได้แก่ ถั่วแดงหลวง (Red kidney bean, *Phaseolus vulgaris* L.)

3. สามารถปลูกถั่วแดงหลวงได้ดีด้วยระบบไฮโดรโพนิกส์

4. การผลิตขยายไรตัวห้ำใช้เวลา 6 - 7 สัปดาห์ ต่อ 1 รอบการผลิต อย่างไรก็ตาม จำนวนไรตัวห้ำที่ผลิตได้อาจเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับสภาพอุณหภูมิในช่วงเวลานั้น หากเพาะเลี้ยงไรในช่วงที่มีการหนาวเย็นมาก ต้นถั่วจะเจริญเติบโตช้า วงจรชีวิตของไรยาวนาน ดังนั้น รอบการผลิตจะยาวนานมากกว่าปกติ เช่น ในช่วงอากาศหนาวเย็นต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส อาจใช้เวลานานประมาณ 8 - 9 สัปดาห์ ต่อ 1 รอบการผลิต

5. การเก็บเกี่ยวไรตัวห้ำเพื่อนำไปใช้ปล่อยลงในแปลงปลูกสตรอเบอรี่และกุหลาบ ต้องระมัดระวังไม่ให้มีไรสองจุดติดไปกับใบถั่วมากนัก เนื่องจากไรสองจุดเป็นไรศัตรูของสตรอเบอรี่และกุหลาบด้วย ให้เก็บเกี่ยวไรตัวห้ำในขณะที่ยังมีประชากรไรสองจุดอยู่บนใบถั่วน้อยมากที่สุดเท่าที่ทำได้ หากปล่อยให้ไม่มีไรสองจุดอยู่บนใบถั่ว ไรตัวห้ำจะหนีออกจากใบถั่วเพื่อไปหาแหล่งอาหารใหม่ทันทีภายในข้ามคืน ทำให้เก็บเกี่ยวไรตัวห้ำไม่ได้ด้วยเช่นกัน ดังนั้น ช่วงเวลาใกล้เก็บเกี่ยว ผู้เลี้ยงต้องให้ความสนใจตรวจดูจำนวนไรที่เป็นเหยื่ออย่างใกล้ชิด

6. การปลูกถั่วในการผลิตรอบที่ 3 - 4 อาจพบต้นถั่วมีโรคโคนเน่าเกิดจากเชื้อรา Pytium จึงควรใส่สารกำจัดเชื้อรา เช่น เมธาแลคซิน (metalaxyl 35%) + ไดชราน (dichran 10%) ลงในน้ำระบบไฮโดรโพนิกส์

ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ *A. californicus* ใน 1 รอบการผลิต มีดังนี้

1. ค่าโรงเรือนขนาด 3x4 เมตร และอุปกรณ์ไฮโดรโพนิกส์ (ลงทุนครั้งแรกเพียงครั้งเดียว) เป็นเงิน 6,350 บาท

2. เครื่องวัดค่าปริมาณเกลือที่ละลายได้ (Electric Conductivity-EC) ในระบบไฮโดรโพนิกส์ (ลงทุนครั้งแรกเพียงครั้งเดียว) เป็นเงิน 4,000 บาท

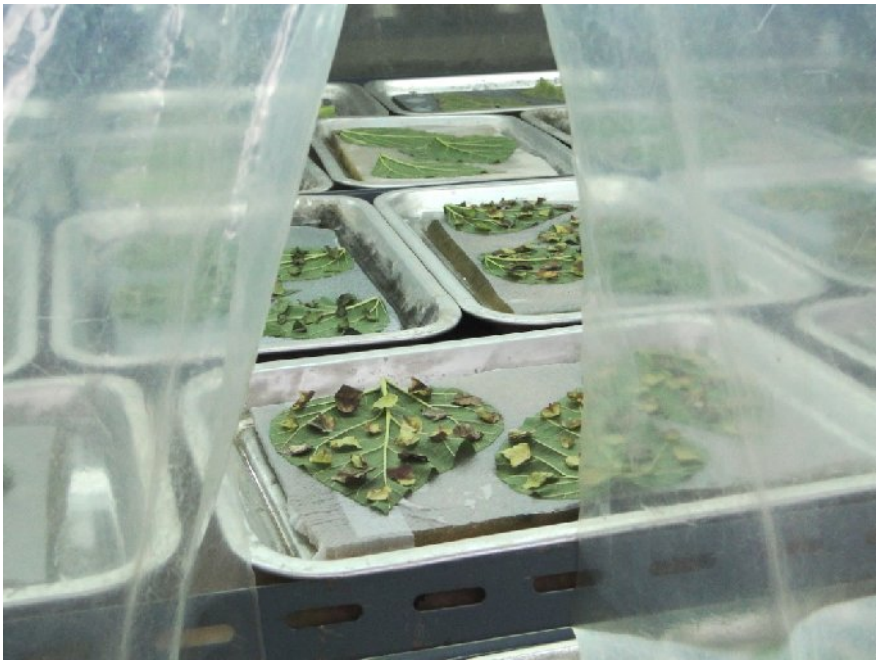
3. ค่าเมล็ดพันธุ์ถั่ว 1,200-1,300 ต้น และปุ๋ย เป็นเงินครั้งละ 210 บาท

4. ค่าแรงครั้งละ 2,275 บาท

สรุปต้นทุนการผลิต

- ลงทุนค่าใช้จ่ายผลิตไรตัวห้ำครั้งแรก 11,830 บาท
- ลงทุนครั้งที่สองและครั้งต่อๆ ไป ครั้งละ 2,485 บาท

รายละเอียดขั้นตอนการผลิตไรตัวห้ำ *A. californicus* เป็นปริมาณมากที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย แสดงไว้ในภาพที่ 23



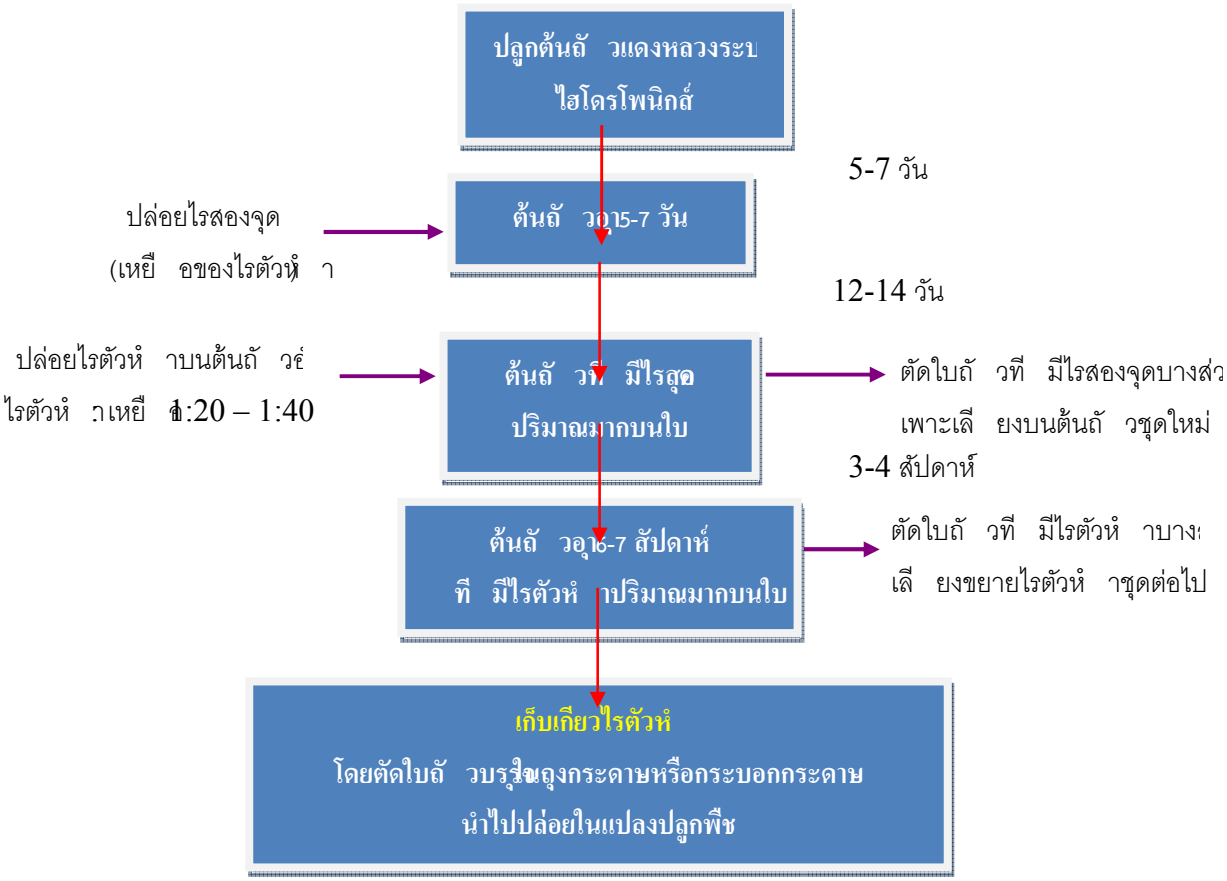
ภาพที่ 18 ไรตัวหำพ่อ-แม่พันธุ์เก็บรักษาบนใบหม่อนในถาดหล่อนำ วางบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซ็นส์กันพลาสติกหนาป้องกันอากาศเย็น ทีสถานีเกษตรหลวงอ่างขาง

ภาพที่ 19 ต้นถั่วดำเพาะในกระถาง 6x8 นิ้ว

ภาพที่ 20 ต้นถั่วแดงหลวงเพาะโดยระบบไฮโดรโพนิคส์

ภาพที่ 21 ต้นถั่วแดงหลวงอายุ 6 วัน พร้อมสำหรับปล่อยไรสองจุด (เหยื)อ

ภาพที่ 22 ต้นถั่วแดงหลวงที มีไรตัวเ็ป็นปริมาณมากอาศัยอยู่ใต้ใบ
พร้อมที จะถูกตัดเพื อนำไ่ปลงในแปลงปลูก



ภาพที่ 23 ขั้นตอนการผลิตไรตัวห้ำ *Amblyseius californicus* (McGregor) บนต้นถั่วแดงหลวง โดยใช้ไรสองจุดเป็นเหยื่อ ในแปลงที่ ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน - มีนาคม

การผลิตไรตัวห้ำ *Amblyseius cinctus* Corpuz and Rimando

ไรตัวห้ำ *A. cinctus* เป็นไรที่สามารถเพาะเลี้ยงได้โดยใช้ไรขาวพริกเป็นอาหาร นอกจากนั้น ไรตัวห้ำ *A. cinctus* สามารถกินเกสรดอกไม้ได้ด้วย จากการทดลอง พบว่า การเลี้ยงไรตัวห้ำเพศเมีย 10 ตัว ด้วยไรขาวพริก (Broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks)) เกสรดอกธูปฤาษี (Narrow leaf cattail, *Typha angustifolia* L.) และเกสรดอกตีนตุ๊กแก (Coat buttons, *Tridax procumbens* L.) สามารถเพิ่มจำนวนประชากรได้เฉลี่ย 67.6, 43.6 และ 44.0 ตัว ใน 1 สัปดาห์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าไรขาวพริกเป็นเหยื่อที่ไรตัวห้ำเพิ่มประชากรได้มากที่สุด สำหรับการผลิตไรตัวห้ำ *A. cinctus* เป็นปริมาณมาก ในการทดลองนี้ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. cinctus* ด้วยไรขาวพริกให้ได้ปริมาณมากบนพืชอาศัยเหมือนการเพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนบนต้นถั่ว แต่สามารถเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำชนิดนี้บนใบหม่อน แล้วให้ไรขาวพริกเป็นอาหารในถาดเท่านั้น นอกจากนั้น จากการทดลองเลี้ยงไรตัวห้ำเพศเมีย *A. cinctus* ด้วยเกสรธูปฤาษี ด้วยจำนวนตั้งต้น 10 ตัว พบว่าสามารถไรตัวห้ำเพิ่มจำนวนได้เฉลี่ย 43.6, 102.0 และ 164.4 ตัว ในเวลา 1, 2 และ 3 สัปดาห์ ตามลำดับ

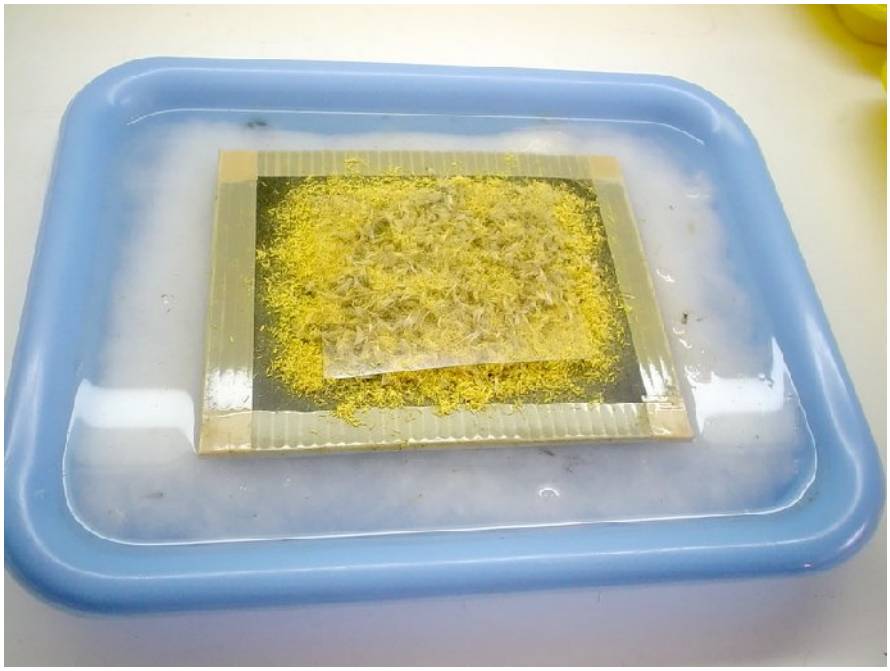
การเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. cinctus* ที่เหมาะสม คือ การเพาะเลี้ยงโดยใช้เกสรดอกธูปฤาษี เกสรดอกตีนตุ๊กแก สลับกับไรขาวพริก

อุปกรณ์ มีดังนี้

- แผ่นพลาสติกฟิวเจอร์บอร์ดสีดำขนาด 12 x 15 เซนติเมตร
- ถาดพลาสติก ขนาด 30 x 35 เซนติเมตร แผ่นพลาสติกใส ขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร
- พู่กันเบอร์ศูนย์
- สำลี
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ
- แว่นขยาย 10 เท่า
- ชั้นติดตั้งหลอดฟลูออเรสเซนส์

วิธีการ มีดังนี้

1. ใช้พู่กันเขี่ยไรตัวห้ำ *A. cinctus* ลงบนแผ่นพลาสติกฟิวเจอร์บอร์ด
2. นำดอกธูปฤาษี เคาะเกสรให้ร่วงลงในกระดาษ แล้วโรยเกสรดอกธูปฤาษีลงบนแผ่นพลาสติกฟิวเจอร์บอร์ดให้เป็นอาหารแก่ไรตัวห้ำ เกสรที่เหลือสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นไว้ใช้ต่อไปได้ประมาณ 2-3 วัน
3. วางแผ่นพลาสติกใสขนาดเล็กกว่าปิดทับด้านบน (ภาพที่ 24) เพื่อไม่ให้เกสรธูปฤาษีฟุ้งกระจายและใช้เป็นที่หลบวางไข่ของไรตัวห้ำ
4. วางแผ่นพลาสติกฟิวเจอร์บอร์ดลงบนสำลีในถาด หล่อน้ำให้ท่วมสำลีอยู่เสมอ เพื่อกันไรตัวห้ำเดินหนีออกจากภาชนะ
5. เติมเกสรธูปฤาษีสดให้เป็นอาหารรตัวห้ำเมื่อเกสรเก่าเริ่มแห้ง
6. วางถาดเลี้ยงไรบนชั้นใต้แสงไฟฟลูออเรสเซนส์ (ภาพที่ 25) ให้แสงสว่าง 9 ชั่วโมงต่อวัน



ภาพที่ 24 ถาดเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *Amblyseius cinctus* ด้วยเกสรธูปฤาษี

ภาพที่ 25 ชั้นเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *Amblyseius cinctus* ใต้แสงฟลูออเรสเซนส์

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ(Conclusion and Suggestion)

การทดลอง 5.1 ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายแตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเป็นปริมาณมาก

สรุปผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาพันธุ์มันสำปะหลังที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *Phenacoccus manihoti*

การศึกษาพันธุ์มันสำปะหลังที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู *P. manihoti* ในสายพันธุ์มันสำปะหลังที่ทำการทดสอบจำนวน 15 พันธุ์/สายพันธุ์ พบว่าจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู เข้าทำลายมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 11 มีจำนวนมากที่สุด จึงเหมาะกับการนำมาใช้เพาะเลี้ยงขยายปริมาณเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูมากที่สุด

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาประสิทธิภาพแตนเบียน *A. lopezi* ต่อการควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูบนผลฟักทองและต้นมันสำปะหลัง

จากผลการศึกษาพบว่าการเลี้ยงขยายปริมาณจำนวนแตนเบียน *A. lopezi* จากเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูบนต้นมันสำปะหลังเปรียบเทียบกับเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูด้วยการเลี้ยงบนผลฟักทอง พบว่าการปล่อยแตนเบียนที่เริ่มต้น 15 คู่ ได้จำนวนเฉลี่ยแตนเบียนเพศผู้สูงสุดคือ 45 ตัว จากการเลี้ยงขยายด้วยเพลี้ยแป้งบนผลฟักทองและ 40.2 ตัว เมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยแป้งบนต้นมันสำปะหลัง

จำนวนเฉลี่ยแตนเบียนเพศเมียที่ได้จากการเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ที่เลี้ยงด้วยต้นมันสำปะหลังและผลฟักทอง พบว่าอยู่ในช่วง 20.4 - 34.8 ตัว

จำนวนเฉลี่ยรวมแตนเบียนทั้งหมดที่ได้สูงสุด จากการปล่อยแตนเบียนจำนวน 15 คู่ คือ 75 และ 76.6 ตัว เมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยแป้งในฟักทองและต้นมันสำปะหลัง ตามลำดับ

อัตราส่วนจำนวนเพศผู้และเพศเมียของแตนเบียน *A. lopezi* พบว่าอยู่ในระดับ 1:0.70-1.15 ตัว

อัตราการเพิ่มขึ้นของจำนวนแตนเบียน *A. lopezi* ที่ได้ พบว่า อัตราการเพิ่มขึ้นของแตนเบียนที่ปล่อยเริ่มต้นจำนวนน้อย คือ 1 คู่ มีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุด 23.1 และ 20.9 เท่า เมื่อเลี้ยงด้วยเพลี้ยแป้งในฟักทองและต้นมันสำปะหลัง

การปล่อยแตนเบียน 1, 5, 10 และ 15 คู่ แตนเบียน *A. lopezi* สามารถเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ได้อยู่ที่ระดับ 41.8–46.2%, 57.2–68.6%, 66.2–67.8% และ 75–76.6% ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแตนเบียน *A. lopezi*

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเก็บรักษาแตนเบียนที่อุณหภูมิ 10 และ 15°C ที่ทุกอัตราบรรจุแตนเบียนสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานมากกว่า 60 วัน และการเก็บรักษาแตนเบียนที่อัตราการบรรจุสูง 30-35 คู่ แตนเบียนสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่าการบรรจุที่ 20-25 คู่

การทดลอง 5.2ศูนย์ต้นแบบการผลิตขยายมวนเพชฌฆาตเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

สรุปผลการทดลอง

การจัดทำรูปแบบการผลิตหนอนนกเป็นขั้นตอน เพื่อเป็นเหยื่ออาหารสำหรับนำไปผลิตมวนเพชฌฆาตเป็นปริมาณมากแบบครบวงจร สำหรับเป็นต้นแบบในการผลิตขยาย โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. ระยะการเจริญเติบโตของหนอนนก อัตราการตายของหนอน อัตราการตายของดักแด้และความสามารถในการขยายพันธุ์ของหนอน

หนอนนกมีระยะไข่, ระยะหนอนมี 1 - 13 วัย และระยะดักแด้ มีอายุเฉลี่ย 10.0 $\pm$ 1.7 (8 - 12 วัน), 107.6 $\pm$ 19.2 (57 – 139 วัน) และ 7.52 $\pm$ 0.8 (6 - 10 วัน) วันตามลำดับ ระยะไข่ - หนอนมีอายุเฉลี่ย 112.8 $\pm$ 21.7 วัน ระยะหนอนและดักแด้มีจำนวนการตายเฉลี่ย 2.0 $\pm$ 0.5 และ 5.2 $\pm$ 2.5% ตามลำดับ การเลี้ยงตัวเต็มวัยโดยใส่สำลีชุบน้ำพอหมาดทำให้ระยะตัวเต็มวัยของหนอนนกมีอายุนานขึ้นคือ 69.2 $\pm$ 16.7วัน (36 - 90 วัน) และทำให้สามารถวางไข่ได้มากขึ้นเฉลี่ย 123.0 $\pm$ 31.4 ฟองต่อตัวเมีย 1 ตัว และทำให้ตลอดชีวิต (ไข่-ตัวเต็มวัยตาย) ของหนอนนกมีอายุนานขึ้นเฉลี่ย 188.0 $\pm$ 25.6 วัน ตัวเต็มวัยเริ่มวางไข่เมื่ออายุ 7 - 10 วัน มีระยะวางไข่นาน 55 - 60 วัน ขนาดความยาวหนอนสมบูรณ์ที่เหมาะสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำ(หนอนมีอายุ 70 วันเป็นต้นไป) คือ 2.6 $\pm$ 0.13 เซนติเมตร (2.4 - 2.8 เซนติเมตร) มีน้ำหนัก 0.114 กรัม/ตัว ดักแด้ที่มีขนาดใหญ่และสมบรูณ์มีน้ำหนัก 0.096 กรัมต่อตัว หรือดักแด้หนัก 1000 กรัม มีจำนวน 10,450 ตัว

2. จัดรูปแบบการผลิตขยายหนอนนกเหยื่ออาหารของมวนเพชฌฆาต ด้วยขั้นตอนต่างๆที่เหมาะสม

สรุปผลได้ว่าการผลิตหนอนนกต่อหน่วย (ถาด) แบบให้น้ำแก่ตัวเต็มวัยเหมาะสมที่สุด เพราะสามารถผลิตหนอนนกได้มากที่สุด โดยเริ่มดำเนินการทุกสัปดาห์จากดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว/ถาด/ชุด/สัปดาห์ สามารถผลิตหนอนนกขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำ(หนอนนกมีอายุ 70 วันเป็นต้นไป) ได้ทั้งหมด 13,976 ตัว หรือมีน้ำหนัก 1593.26 กรัม/ชุด/สัปดาห์ ถ้าเลี้ยงต่อให้เป็นดักแด้จะผลิตดักแด้ได้ทั้งหมดหนัก 1337.42 กรัม/ชุด/สัปดาห์ ใช้อาหารไก่ใหญ่เลี้ยงทั้งหมดหนัก 5,670 กรัม/ชุด/สัปดาห์ ใช้ต้นทุนค่าอาหารในการผลิต 79 บาท/ชุด/สัปดาห์ ใช้เวลาในการเลี้ยงทั้งหมดประมาณ 188 วัน/ชุด ดังนั้นในการผลิตมวนเพชฌฆาตให้ได้จำนวน 10,000 ตัว/ชุด/สัปดาห์ ต้องผลิตหนอนนกหรือดักแด้หนอนนกจำนวน 12,900 ตัว/ชุด/สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นอาหารแก่มวนตัวห้ำ เริ่มขบวนการผลิตโดย

1) นำดักแด้หนอนนกที่มีขนาดใหญ่และสมบูรณ์ หนัก 40 กรัม ใส่ลงในถาดพลาสติก 1 ถาด จำนวนที่เริ่มผลิตต่อถาดเป็นจำนวนที่เหมาะสมที่ทำให้จำนวนหนอนและดักแด้ที่ผลิตได้มีปริมาณที่พอเหมาะที่ทำให้หนอนและดักแด้ทุกตัวมีขนาดใหญ่และสมบรูณ์ ดักแด้มีการตายเฉลี่ย 5 % และมีอายุ 8 วัน จะลอกคราบเป็นตัวเต็มวัย

2) โรยอาหารไก่ใหญ่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลงในถาด 40 กรัม พร้อมสำลีหรือผ้ายืดหรือผ้าสำลีขนาด 4 x 4 ตารางนิ้ว ชุบน้ำพอหมาดลงบนเพลทพลาสติกวางบนพื้นถาด ชุบน้ำ 2 ครั้ง/สัปดาห์ ตัวเต็มวัยอายุ 7 – 10 วัน จะเริ่มวางไข่ติดบนพื้นถาดโดยมีเศษอาหารปกคลุม

3) ใช้ตะกร้าร่อนตัวเต็มวัยออกจากอาหาร นำตัวเต็มวัยใส่ลงถาดใบใหม่เติมอาหารไก่ที่ตำให้เม็ดอาหารมีขนาดเล็กลง หนัก 40 กรัม/ถาด/การเก็บไข่ 1 ครั้ง พร้อมสำลีหรือเศษผ้ายืดหรือผ้าสำลีชุบน้ำพอหมาด

4) ส่วนอาหารทั้งหมดที่ร่อนออกมานำกลับมาใส่ในถาดไข่ดังเดิมเพื่อนำมาเลี้ยงต่อไป ไข่เก็บได้ทั้งหมด 4 ครั้ง เริ่มจากตัวเต็มวัยฟัก โดย 3 ครั้งแรกทำทุก 15 วัน/ครั้ง และทิ้งไว้ 25 วัน จะเก็บไข่ครั้งที่ 4 ช่วงระยะเวลาไข่นาน 64 วัน ตัวเต็มวัยมีอายุเฉลี่ย 68 วัน

5) หนอนนกตั้งแต่วัย 1 - 13 เลี้ยงด้วยอาหารไก่ เมื่ออาหารในถาดถูกกินจนป่นจะเติมอาหารอีกครั้งละ 500 กรัม/ถาด ประมาณ 2 – 3 ครั้ง/ถาด เมื่อหนอนนกลอกคราบครั้งสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นดักแด้ อาหารจะถูกกินจนป่นเกือบหมด ระยะหนอนมีการตายเฉลี่ย 2 %

6) จำนวนหนอนนกขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงมวนตัวห้ำ (หนอนนกมีอายุ 70 วันเป็นต้นไป) ที่ผลิตได้ทั้งหมดจำนวน 13,976 ตัว หรือมีน้ำหนัก 1593.26 กรัม เมื่อหนอนมีอายุ 107 วัน จะลอกคราบเป็นดักแด้

7) ดักแด้ที่ผลิตได้ทั้งหมดมีน้ำหนัก 1337.42 กรัม ตัวเต็มวัยรุ่นพ่อ-แม่และดักแด้ที่ผลิตได้ทั้งหมดใช้อาหารรวม 5,670 กรัม มีต้นทุนค่าอาหารในการผลิต 79 บาท

8) เก็บดักแด้ที่ได้ใส่ถาดใบใหม่นำไปเลี้ยงต่อไป และนำถาดเลี้ยงเดิมไปล้างทำความสะอาดตากแดด

9) ดักแด้บางส่วนที่ยังไม่ต้องการเลี้ยงต่อ นำมาใส่ในกล่องพลาสติกที่ปูด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์โรยดักแด้กระจายให้ทั่ว ปิดด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ นำไปเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 – 2 สัปดาห์ เมื่อนำดักแด้ออกจากตู้เย็นทิ้งไว้นาน 4 – 7 วัน ดักแด้จะฟักเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ทุกตัว และมีประสิทธิภาพในการผลิตหนอนคงเดิม

10) การทำความสะอาดถาดเลี้ยงหนอนตั้งแต่วัย 1 โดยใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมา และใช้ตะแกรงร่อนเศษอาหารที่ป่นและมูลหนอนออกทิ้ง ทุก 30 วัน จนถึงหนอนอายุ 90 วัน และหลังจากนี้ทุก 10 วัน จะใช้พัดหรือพัดลมพัดคราบผนังลำตัวที่หนอนลอกออกมาเพื่อสะดวกในการเก็บดักแด้

11) เริ่มดำเนินการผลิตตามขั้นตอนที่ 1 ทุกสัปดาห์ด้วยดักแด้หนอนนกหนัก 40 กรัม หรือจำนวน 418 - 420 ตัว/ชุด/สัปดาห์ เพื่อใช้เป็นอาหารผลิตขยายมวนเพชฌฆาต 1 ชุด จำนวน 10,000 ตัว/สัปดาห์

การทดลอง 5.3 ต้นแบบการผลิตขยายไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก

สรุปผลการทดลอง

การผลิตไรตัวห้ำ *A. longispinosus* : ปัญหาและข้อเสนอแนะ

การผลิตไรตัวห้ำ *A. longispinosus* ให้ได้ปริมาณมากจำเป็นต้องมีการเพาะกล้าต้นถั่ว เตรียมไว้เพื่อขยายไรอาหารอย่างต่อเนื่อง และให้มีเวลาสอดคล้องกับการนำต้นถั่วย้ายไปเลี้ยงขยายไรตัวห้ำ ปัญหาของการเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำที่ทำให้ไม่สามารถดำเนินการได้อย่างต่อเนื่อง ก็คือ การปนเปื้อนของไรตัวห้ำในระหว่างขั้นตอนการเพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนในโรงเรือน ทำให้ไรแดงหม่อนไม่สามารถเพิ่มประชากรเป็นปริมาณมากได้ ซึ่งผู้เลี้ยงต้องระมัดระวังเป็นพิเศษ โดยต้องทำงานในโรงเพาะเลี้ยงไรอาหารก่อนเข้าไปทำงานในโรงเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำเสมอ ไม่ใช้อุปกรณ์ร่วมกัน ถ้าเกิดการปนเปื้อน ต้องหยุดพักโรงเรือน 5 - 7 วัน จึงดำเนินการต่อ

อีกสาเหตุหนึ่งที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงไรแดงหม่อนได้เป็นปริมาณมาก คือ มีแมลงศัตรูอื่นๆ เข้ามาระบาดบนต้นถั่ว เช่น เพลี้ยไฟ แมลงวันหนอนชอนใบ แมลงเหล่านี้ดูดกินทำลายใบถั่ว ทำให้ต้นถั่วอ่อนแอ ใบเล็กหงิกงอและต้นโทรม เป็นเหตุให้ไรแดงหม่อนขยายพันธุ์ไม่เต็มที่ สามารถแก้ปัญหาได้ โดยการพ่นสารอิมิดาคลอพริด (imidacloprid 10% SL) ตั้งแต่ต้นถั่วเริ่มแตกใบแท้ชุดแรกดังที่กล่าวมาแล้ว หากแมลงเข้าทำลายอีกหลังปล่อยไรแดงหม่อนลงบนต้นถั่วไปแล้ว ให้พ่นสารฆ่าแมลงซ้ำ จากนั้นทิ้งไว้ 7 - 8 วัน จึงปล่อยไรแดงหม่อนเพิ่มเติมลงบนต้นถั่ว เพื่อให้ขยายพันธุ์ต่อไปได้

การผลิตไรตัวห้ำ *A. californicus* : ปัญหาและข้อเสนอแนะ

การผลิตไรตัวห้ำ *A. californicus* มีวิธีการคล้ายกับการผลิตไรตัวห้ำ *A. longispinosus* มีปัญหาและการแก้ไขปัญหาเช่นเดียวกัน

การผลิตไรตัวห้ำ *A. cinctus* : ปัญหาและข้อเสนอแนะ

ไรตัวห้ำ *A. cinctus* เป็นตัวห้ำชนิดที่กินเหยื่อแบบไม่เฉพาะเจาะจง (Generalist) สามารถกินน้ำหวานและเกสรจากดอกไม้ได้ และที่สำคัญมีอุปนิสัยกินไข่ ตัวอ่อน และตัวต็มวัยของไรชนิดเดียวกันเองด้วย (Cannibalism) ซึ่งแตกต่างจากไรตัวห้ำ *A. longispinosus* ที่กินเหยื่อแบบเฉพาะเจาะจง (specialist) ดังนั้น จึงพบว่า การเพาะเลี้ยงในที่จำกัดไรตัวห้ำ *A. cinctus* จะเพิ่มจำนวนประชากรได้ช้า

นอกจากนั้น จากการสังเกตุ พบว่า เมื่อให้ไรขาวพริกและเกสรธูปฤาษีเป็นอาหาร ไรตัวห้ำ *A. cinctus* จะเลือกกินไรขาวพริกมากกว่า และกินเกสรธูปฤาษีเมื่อกินไรขาวพริกหมดแล้ว ดังนั้น การผลิตไรตัวห้ำ *A. cinctus* อย่างต่อเนื่อง จึงควรให้ไรขาวพริกเป็นอาหารสลับเป็นระยะ ๆ การเพาะเลี้ยงไรตัวห้ำ *A. cinctus* เป็นจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อยอดเพิ่มเติม เพราะการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถผลิตไรตัวห้ำชนิดนี้เป็นปริมาณมากได้

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี ได้เทคนิควิธีการผลิตขยายและการนำชีวินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์และถ่ายทอดสู่กลุ่มเป้าหมายหลายชนิด เช่น การวิจัยพัฒนาการผลิตขยายแตนเบียนเป็นปริมาณมากเพื่อควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง สีชมพู ต้นแบบการผลิตหนอนนกเพื่อใช้ผลิตขยายแมลงศัตรูธรรมชาติ พัฒนาการผลิตภัณฑ์ BS เพื่อควบคุมโรคพืช

นอกจากนี้ยังมีผลการวิจัยที่สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาต่อยอดงานวิจัย เช่น การสำรวจและคัดเลือกศัตรูธรรมชาติที่มีศักยภาพ เช่น ด้วงเต่าตัวห้ำ ผีเสื้อตัวห้ำ หอยตัวห้ำ ตลอดจนการคัดเลือกจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีศักยภายในการควบคุทโรคพืช การเพาะเลี้ยงแมลงเบียนและแมลงห้ำ การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV การผลิตขยายไวรัส NPV ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยง การพัฒนาการผลิตและการใช้เชื้อราควบคุมแมลงศัตรูพืช การพัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช ประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยในการควบคุมแมลงศัตรูพืช การพัฒนาเชื้อปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช อย่างไรก็ตามแม้ผลการทดลองที่สามารถถ่ายทอดสู่เกษตรกรและกลุ่มเป้าหมายแล้ว ก็จะต้องมีการวิจัยเพื่อพัฒนาต่อไปเพื่อให้ได้ชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรค แมลง และสัตว์ศัตรูพืช วิธีการนำชีวินทรีย์ไปใช้ และการพัฒนาเป็นรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในสภาพแปลงให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้น เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตรต่อไป

บรรณานุกรม
เอกสารอ้างอิงกิจกรรมที่ 1

จุรีรัตน์ รัตนทิพย์, นุชรีย์ ศิริ และ อังศุมาลย์ จันทราปัตย์. 2551. ประสิทธิภาพการห้ำของด้วงเต่า *Stethorus*spp. ต่อไรสองจุด *Tetranychusurticae* Koch. ว. วิทย์. กษ. 39(3)(พิเศษ).น. 226-229.

ทัศนีย์ แจ่มจรรยา, นุชรีย์ ศิริ และ สุนิสา ผ่านพินิจ. 2557. ชีวประวัติของมวนเพชฌฆาต *Sycanus collaris* (Hemiptera: Reduviidae) และประสิทธิภาพในการควบคุมศัตรูพืช. ได้รับ 26 กุมภาพันธ์ 2557, จาก http://ag2.kku.ac.th/kaj/PDF.cfm?filename=O21.pdf&id=1191&keeptrack=6

บุปผา เหล่าสินชัย ชลิดา อุณหวุฒิ. 2543. เพลี้ยแป้ง และเพลี้ยหอยศัตรูพืชที่สำคัญ.กลุ่มงานอนุกรมวิธาน กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. ISBN 974-7466-79-168 หน้า.

ประภัสสร เชยคำแหง รจนา ไวยเจริญ และอัมพร วิโนทัย 2553.เปรียบเทียบประสิทธิภาพการควบคุมแมลงศัตรูพืชของแมลงช้างปีกใสสกุล *Mallada basalis* และ *Plesiochrysa ramburi* ในห้องปฏิบัติการ รายงานผลงานวิจัยประจะปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

ประภัสสร เชยคำแหง. 2551 แมลงห้ำ แมลงช้างปีกใส. *ใน* เอกสารประกอบการประชุมสัมมนา หน้า 19-26 เทคโนโลยีการใช้ชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร. 6-7 พฤษภาคม 2551 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ

รจนา ไวยเจริญ อัมพร วิโนทัย และประภัสสร เชยคำแหง. 2556. เทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้แตนเบียนสกุล *Encarsia* เพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว. หน้า 614-626. *ใน* รายงานผลการวิจัยประจำปี 2556. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

รัตนา นชะพงษ์ และคณะ. 2548. อนุกรมวิธานมวนในสกุล *Sycanus* และ *Polytoxus* วงศ์ Reduviidae และการเก็บรักษา. เอกสารวิชาการรายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 (3). สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 53 - 69.

รัตนา นชะพงษ์. 2551. มวนพิฆาต. *ใน*: เอกสารวิชาการเทคโนโลยีการใช้ชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: กรุงเทพฯ. หน้า 27 - 42.

วัชรี สมสุข สุธน สุวรรณบุตร และ พิมลพร นันทะ. 2534. ศึกษาการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*(Weiser) ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศในสภาพธรรมชาติ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2534 กองกีฏและสัตววิทยา. 10 หน้า.

วัฒนา จารณศรี, มานิตา คงชื่นสิน, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2544. ไรศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานวิจัยไรและแมงมุม กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร.

ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว และ นุชรีย์ ศิริ. 2555. ชีววิทยาและประสิทธิภาพของด้วงเต่า (*Stethorus*spp.) ตัวห้ำ 3 ชนิด ต่อการทำลายไข่ของไรแมงมุม. แก่นเกษตร. 40: 313-320.

ศิริลักษณ์ ล้านแก้ว และ นุชรีย์ ศิริ. 2556. ความสามารถในการห้ำและชีววิทยาของด้วงตัวห้ำ *Stethorusindira* Kapur ต่อไรสามชนิด แก่นเกษตร41 ฉ. 1.

สมหมาย ชื่นราม. 2545. ด้วงเต่าในประเทศไทย. กลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 211 หน้า.

สุนัดดา เชาวลิต ชมัยพร บัวมาศ อิทธิพล บรรณาการ เกศสุดา สนศิริ และสิทธิศิโรดม แก้วสวัสดิ์. อนุกรมวิธานแมลงหวี่ขาวในมันสำปะหลัง. หน้า 70-80. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

Ackery, P.R. 1990. Biocontrol potential of African lycaenid butterflies entomophagous on Homoptera. Journal of African Zoology**.** 104,581-591.

Aitken EH (1894). The larva and pupa of *Spalgis epius* Westwood. J Bombay Nat Hist. Soc 8:485-489.

Anegunda S, Dinesh Melally G, Venkatesha (2001) Development, life history Characteristics and behaviour of mealybug predator, Spalgis *epius* (Westwood) (Lepidoptera: Lycaenidae) on *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera: Pseudococcidae) J Pest Sci DOI 10.1007/s 10340-010-0303-8.

Anonymous, 2006. Distribution of plant pests: Map on. 476. CABI Head office. Wallimgford. UK.

Arnold H. Hara, 2011 Controlling Spiraling Whitefly in the Landscape. *In* CPS Seminar May 13, 2011 University of Hawaii at Manoa.

Balduf, W. V. 1938. The rise of entomophagy among Lepidoptera. Amer.Nat., 72: 358-379

Chien, C.C., L.Y. Chou and S.C. Chang. 2000. Introduction, Propagation, and Liberation of Two Parasitoids for the Control of Spiraling Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) in Taiwan. *Chinese J. Entomol*. 20:163-178.

Das, S. and Mukhopadhyay, A. 2008. Rearing of *Sycanus croceovittatus* Dohrn (Heteroptera: Reduviidae) on termite food. *In*: Recent Trends in Insect Pest Management. Elite Publishing House Pvt Ltd: New Delhi. pp. 144–145.

Dromph, M.K and Vestergaard, S. 2002 Pathogenicity and Attractiveness of Entomopathogenic Hyphomycetes Fungi to Collembolans, *Applied Soil Ecology, 21*, 197-210.

Fujiwara,C.and M.Nomura 1999 Effect of photoperiod and temperature on larval development of *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae). *Jpn. J. Appl. Entomol.Zool.* 43: 175-179.

Geetha, B 2000. Biology and management of spiraling whitefly *Aleurodicus disperses* (Russell) (Homoptera : Aleurodidae) *Ph.D Thesis*, Tamil Nadu Agric. Univ., Coimbatora (India).

Gopi.D.,Neelannavar. T.N. and Thirumurthi.S., 2001. Incidence of spiralling whitefly, *Aleurodicus disperses* among tree species. Paper presented *In : Nation. Sem. Emerging Trends Pests & Diseases Mgmt.* Coimbatore, October 2001. Tamil Nadu Agric. Univ. Coimbatore, India. pp. 11-13.

Gotoh, T., M. Nozawa and K. Yamaguchi. 2004. Prey consumption and functional response of three acarophagous species to egg of two spotted spider mite in laboratory. Applied Entomology and zoology. 39 (1): 97-105.

Gowda DKS, Manjunath D, Datta RK, Kumar P(1996) *Spalgis epius* Westwood (Lepidoptera: Lycaenidae) a potential predator of mulberry mealybug, *Maconellicoccus hirsutus*. Insect Environ 2: 87-88.

Grundy, P.R. 2007. Utilizing the assassin big, *Pristhesancus plagipennis* (Hemiptera: Reduviidae), as a biological control agent within an integrated pest management programme for *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) *Creontiades* spp. (Hemiptera: Miridae) in cotton. Retrieved March 8, 2007, from http://journals. cambridge.org.

Grundy, P.R., and D.A. Maelzer. 2002. Augmentation of the assassin bug *Pristhesancus plagipennis* (Walker) (Hemiptera: Reduviidae) as a biological control agent for *Helicoverpa* spp. in cotton. Retrieved September 24, 2007, from www.blackwell-synergy.com

Kajita, H., M. Samudra and A. Naito. 1991. Discovery of the spiraling whitefly *Aleurodicus disperses* Russell (Homoptera: Aleyrodidae) from Indonesia with notes on its host plants and natural enemies. *Appl. Entomol. Zool.* 26: 397-400.

Kaya, H.K and Arnold H.H 1981. Susceptibility of Lepidopterrous pupae to the Entomogenous Nematode *Neoaplectana carpocapsae*. Journal of nematology 13(3): 291-294.

Koppenhofer, A.M. 2000. Nematodes, pp. 283-301. *In* H.K Kary [ed],. Field manual oftechniques in invertebrate pathology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht,The Netherlands.

Le Pelley RH (1968). Pests of coffee. Longmans Green and Co Ltd, London

Legaspi, J.C., B.C. Legaspi , R.I. Carruthers, J. Goolsby, W.A. Jones, A.A. Kirk, C. Moomaw, T.J. Poprawski, R.A. Ruiz, N.S. Talekar and D. Vacek. 1996. Foreign exploration for natural enemies of *Bemisia tabaci* from Southeast Asia. *Subtropical Plant Science* 48: 43-48.

Lenteren, J.C. van and J. Woets. 1988. Biological and integrated pest control in greenhouses. *Ann.Rev.Entomol*. 33: 239-269.

Lenteren, J.C. van. 2003. Commercial Availability of Biological Control Agents. pp. 167-179. *In* J.C. van Lanteren (eds.) Quality Control and Production of Biological Control Agents. Theory and Testing Procedures. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK.

Lohman DJ, Samarita VU (2009) The biology of carnivorous butterfly larvae (Lepidoptera: Miletini) and their ant-tended hemipteran prey in Thailand And Philippines. J nat Hist 43: 569-581

Main.M.and Krishnamoorthy. A. 1999. Development and predatory potential of the green lacewing. *Malada astus* (Banks) (Neuroplera Chrysopidae) on the spiraling whitefly *Aleurodicus disperses* Russell (Homoptera : Aleurodidae). J. Biol. Control: 13: 45-49.

Mani, M. and A. Krishnamoothy. 2006. Colonization of introduced parasitoid, *Encarsia guadeloupae* Viggiani, on the exotic spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus* Russell infesting ornamentals. *J. Hort. Sci*. 1(2): 148-151.

Mani. M and Krishnamoorthy(1996). A. Pest Manage. Hortic. Ecosyst .1996. **2**.49-50

Naher, N., W. Islam and M. H. Haque. 2005. Predation of three predators on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). J. Life Earth Science. Vol 1 (1). Pp.

Neuenschwander P. 1994. Spiraling whitefly, *Aleurodicus dispersus*, a recent invader and new cassava pest. *African Crop Science Journal* 2(4): 419-421.

Obinna, A., P. Neuenschwander and S. Korie. 2011. Niche separation between *Encarsia dispersa* and *Encarsia guadeloupae*, two biological control agents of the spiraling whitefly *Aleurodicus dispersus*, in Benin, West Africa. *BIOCONTROL* 56(3): 277-282.

Palaniswami, M.S., K.S. Pillai, R.R. Nair, and C. Mohandas. 1995. A New Cassava Pest in India. *Cassava Newslett*. 19, 6-7.

Pierce NE (1995) Predatory and parasitic Lepidoptera: carnivores living on plants.J Lepid Soc 49:412-453.

Ramani, S., J. Poorani and B.S. Bhumannavar. 2002. Spiraling whitefly, *Aleurodicus disperses*, in India. *Biological News and Information* 23(2): 55-62.

Rojht H. Kac M. Trdan S. 2009. Nontarget effect of entomopathogenic nematodes on Larvae of twospotted lady beetle (Coleoptera: Coecinellidae) and greenlacewing (Neuroptera : Chrysopidae) under laboratory conditions. *J Eoon Entomo 2009.* Aug (4): 1440-3

Ronald,F.L.m.and J.L.M. Kessing.(1992) *Bemisia tabaci* (Gennadius): Sweetpotato Whitefly.November 22, 2002 from the World Wide Wed:http://Wed:http://www.extento.hawaii.edu/Kbase/Crop/Type/b_tabaci.htm.

Sagne J.-C.,Moreau R.,Canard M. & Bttsch J. 1986 : Glucidic variations in the Lacewing*Chrysoperla* walkeri during the prepupal diapause *.Entoml..Exp . Appl.* 41: 101-103.

Sahayaraj, K. 2002. Small-scale laboratory rearing of a reduviid predator, *Rhynocoris marginatus* Fab. (Hemiptera: Reduviidae) on *Corcyra cephalonica* stainton larvae by larval card method. *Journal of Central European Agriculture.* 3(2): 137-147.

Sahayaraj, K. and M. G. Paulraj. 2001. Rearing and life table of reduviid predator *Rhynocoris marginatus* Fab. (Hemiptera: Reduviidae) on *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. J. Appl. Entomol. 125(6): 321-325

Sahayaraj, K. and P. Sathiamoorthi. 2002. Influence of different diets of *Corcyra cephalonica* on life history of a reduviid predator *Rhynocoris marginatus.* Retrieved March 8, 2007, from http://www.agr.hr/jcea/issues/jcea3_ 1/jcea31_8.html

Tauber C.A. & Tauber M.J.1981: Insect seasonal cycles: genetics and evolution. *Annu. Rev. Evol.* System. 12: 281-308.

Thungrabead, M. Tongma< S. 2007. Effect of Entomopathogenic Fungi *Beauveria Bassiana* (BALSAM) and *Metarhizium anisopliae* (MATSCH) on non target insects.

Weeden, C.R., A.M. Shelton and M.P. Hoffman. 2009. Biological Control: A Guide to Natural Enemies in North America. (Online) http:www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/ (21 Aug. 2009).

Wen, H.C., T.C. Hsu and C.N. Chen. 1994. Supplementary description and host plants of the spiraling whitefly, *Aleurodicus disperses* Russell. *Chinese J. Entomol*. 14: 147-161.

เอกสารอ้างอิงกิจกรรมที่ 2

กนกพร อุ่นใจชน สุเทพ สหายา อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก และเกศรา จีรจรรยา. 2537. การศึกษาความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ต่อหนอนกระทู้หอม. รายงานการค้นคว้าและวิจัย ปี 2537. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูฝ้ายและพืชเส้นใย. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

กรมวิชาการเกษตร. 2542. นโยบายการอารักขาพืชของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ. 2542. แมลงศัตรูผัก. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 97 หน้า.

กองกีฏและสัตววิทยา. 2544. เทคโนโลยีทางเลือกสำหรับ ไอ พีเอ็ม. *ใน* รายงานผลการดำเนินงาน การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน ครั้งที่ 4 วันที่ 29-31 สิงหาคม 2544. โรงแรมรีเจนท์ชะอำ ชะอำ เพชรบุรี. 309 หน้า.

จอมสุรางค์ ดวงสนธิ วีรเทพ พงษ์ประเสริฐ ไสว บูรณพานิชพันธุ์ และจิราพร ตยุติวุฒิกุล. 2550. ชีววิทยาและนิเวศวิทยาของด้วงหมัดผักแถบลายในเขตภาคเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วิทยาสารกำแพงแสน. 5 (1): 20-29.

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. อาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ มานิตา คงชื่นสิน วัฒนา จารณศรี และพิเชฐ เชาวน์วัฒนวงศ์. 2545. การศึกษาความต้านทานต่อสารฆ่าไรบางชนิดของไรแดงแอฟริกันในสวนส้ม. เอกสารวิชาการการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 13 ประจำปี 2545. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

ทิพย์วดี อรรถธรรม และ สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2530. เอกสารวิชาการ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง : นิวคลีโอโพลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 395 น.

ประภาพร ฉันทานุมัติ ทิพยา ไกรทอง และยุพิน กสินเกษมพงษ์. 2556. การพัฒนาการใช้เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin เพื่อป้องกันกำจัดมอดเจาะผลกาแฟในแปลงกาแฟ. *ใน* รวมงานวิจัย “กาแฟโรบัสต้า” ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร เล่ม 1 หน้า 231 – 237.

ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, สมศักดิ์ ศิริผลตั้งมั่น, อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก, ลัดดาวัลย์ งามวงศ์ธรรม, จักรพงศ์ พิริยผล, นิยมรัตน์ ไตรศรี และไพศาล รัตนเสถียร. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 2540. หน้า 37 –48.

มลิวัลย์ ปันยารชุน และ สุรพล ตรุยานนท์ .2525. ศึกษาการพัฒนาการผลิตเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เพื่อใช้ควบคุมด้วงแรดมะพร้าว, หน้า 1-6. *ใน* รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2525 กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

ยุพิน กสินเกษมพงษ์ ประภาพร ฉันทานุมัติ และไพรัตน์ ช่วยเต็ม. 2545. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ที่มีผลต่อการตายของมอดกาแฟในห้องปฏิบัติการ. *ใน* การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ปี 2545. รวมงานวิจัย “กาแฟโรบัสต้า” ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร เล่ม 1 หน้า 239 – 244.

วัชรี สมสุข พิมลพร นันทะ และเอนก บุตรรักษ์. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* ในดาวเรืองด้วยไส้เดือนฝอย ผลงานแผ่นภาพ ในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 9 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 55-62.

วัชรี สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2544. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้าจัดพิมพ์โดย กรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 172 หน้า.

วัชรี สมสุข. 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, หน้า 209-244. ใน การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วัชรี สมสุข และ วิไลวรรณ เวชยันต์. 2547. ประสิทธิภาพการเข้าทำลายหนอนผีเสื้อของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ใน การประชุมวิชาการประจำปี 2547 ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ. 22-25 มิถุนายน 2547 ณ โรงแรมโนโวเทล โคลาเรีย ริมเพ อ.แกลง จ.ระยอง.

วัชรี สมสุข วินัย รัชตปกรณ์ชัย และพิมลพร นันทะ. 2534. การใช้ไส้เดือนฝอย Steinnernema carpocapsae (Weiser) ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว. วารสารกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาเกษตร. 13: 183 – 188.

วัชรี สมสุข วินัย รัชตปกรณ์ชัย และพิมลพร นันทะ. 2534ก. การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinnernema carpocapsae* (Weiser) ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว. วารสารกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาเกษตร. 13 : 183 – 188.

วัชรี สมสุข สุธน สุวรรณบุตร และพิมลพร นันทะ. 2534ข. ศึกษาการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinnernema carpocapsae* (Weiser) ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศในสภาพธรรมชาติ. รายงานผลวิจัยประจำปี 2534 กองกีฏและสัตววิทยา.10 หน้า.

วัชรี สมสุข, อัจฉรา ตันติโชดก และอุทัย เกตุนุติ. 2529. ไส้เดือนฝอยควบคุมหนอนกินใต้ผิวเปลือกไม้สกุลลางสาด. *ว. กีฏ. สัตว์.* 8(3): 115-119.

วัชรี สมสุข. 2540. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.). วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 19 (2):107–109

วินัย รัชตปกรณ์ชัย. 2533. การป้องกันกำจัดด้วงหมัดผักในผักกาดหัว วารสารกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 12 : 4-10.

ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. 2533. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางโภชนาการ. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตส่หกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 264 น.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และ อิศเรส เทียนทัด. 2556. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สูตรต่างๆที่ผลิตด้วยวิธี Encapsulation. .*ใน* รายงานประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, เกรียงไกร จำเริญมา และ สาทิพย์ มาลี. 2553. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae*. หน้า 842-853. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 1/2554 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, อภิรัชต์ สมฤทธ์ และอนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ. 2548. การวิจัยและพัฒนาการผลิตและใช้เชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* เพื่อประโยชน์ทางการเกษตร, น. 1785-1808. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มปี 2548 เล่มที่ 2 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN: 374-436-561-7

เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์, อิศเรส เทียนทัด, วิไลวรรณ เวชยันต์ และ ยุทธนา แสงโชติ. 2554. ศึกษาอัตราการใช้เชื้อราเขียว *M. anisopliae* (Metsch) Sorokin ในการควบคุมหนอนด้วงแรดมะพร้าว. หน้า 2104 - 2113. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2554 เล่ม 4. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 1/2555 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ

สุเทพ สหายา สุพจน์ กิตติบุญญา ลักขณา บำรุงศรี และเกศรา จีรจรรยา. 2541. การศึกษาความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆ ต่อหนอนกระทู้หอม. รายงานการค้นคว้าและวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูฝ้ายและพืชเส้นใย. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2544. เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนคืบกะหล่ำปลี. น. 73-78. *ใน* เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ. ครั้งที่ 5. 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จ.กาญจนบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข สาทิพย์ มาลี และ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2551. วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง *(in vitro)*. น. 1-11. *ใน* เอกสารผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2550. การประชุมวิชาการประจำปี 2551 กรมวิชาการเกษตร. วันที่ 16-18 มิถุนายน 2551. ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต อุทัย เกตุนุติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV. น. 447-458. *ใน* เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 12. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 28-31 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมอมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต 2545. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช เอกสารประกอบการบรรยายเชิงปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต พิมลพร นันทะ และ วัชรี สมสุข.. 2545. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทยจากเอ็มบริโอ. น. 197-206. *ใน* เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “เทคโนโลยีการจัดการแมลงและสัตว์ศัตรูพืชเพื่อเกษตรดีที่เหมาะสม” ครั้งที่ 13. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร . 6-9 สิงหาคม 2545. ณ โรงแรม โกลเด้นแซนด์ จังหวัดเพชรบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และ สาทิพย์ มาลี. 2548. การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV. รายงานผลงานประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2542 เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ หน้า 72-82 ใน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารชีวินทรีย์กำจัดศัตรูพืช *ใน*ศตวรรษที่ 21 จัดโดย สมาคม กีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 15-16 กรกฎาคม, โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ

โสธร ประเสริฐผล. 2512. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์. กสิกร. 42(3) : 289-305.

อัจฉรา ตันติโชดก และอุทัย เกตุนุติ. 2536. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในการป้องกันกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้ายบนส้มเขียวหวาน. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2536. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ, กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

อัจฉรา ตันติโชดก และอุทัย เกตุนุติ. 2537. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสูตรผงละลายน้ำในการควบคุมหนอนกระทู้หอมบนองุ่น. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2537. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 22-29.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2527. การศึกษาความคงทนของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* บนกะหล่ำปลีในสภาพไร่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2527. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 110-114.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2534. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 148-166. *ใน* : เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2537. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย. หน้า 9-37. *ใน* : การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและ สัตววิทยา และสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1 จังหวัดเชียงใหม่. กรมวิชาการเกษตร.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2539. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารทางวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 163-182.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที: การควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 183-208. *ใน*: การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2537. ปรับปรุงการผลิตและทำสูตรสำเร็จของไวรัส NPV. น. 457-486. *ใน* เอกสารวิชาการ การประชุมสัมมนาวิชาการ"แมลงและสัตว์ศัตรูพืช" ครั้งที่ 9 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก, จารุวัตถ์ แต้กุล และพิมลพร นันทะ, 2543. การพัฒนาการผลิตไวรัส NPV ปัญหาและแนวทางแก้ไข. การประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช ประจำปี 2543. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 543-559.

อุทัย เกตุนุติ. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอมด้วยเชื้อไวรัส. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 16 หน้า.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. หน้า 141-182. *ใน*: การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

Bedding, R.A. 1981. Low cost In Vitro mass production of Neoaplectana and Heterorhabditis species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica. 27 : 109-114.

Bell, M.R. and Romine, C.L. 1980. Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. *J. Econ. Entomol*., 73, 427-431.

Beron, C. M., L. Curatti and G. L. Salerno. 2005. New strategy for identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 71(2): 761-765.

Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers. 537 p.

Cabanillas, H.E., Poinar, G.O., Raulason, J.R. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) from Texas. Fundam. Appl. Nematol; 17 (2), 123-131.

Chancey, G., Jr., Yearian, W.C., and Young, S. Y. 1973. Pathogen mixtures to control insect pests.Ark. Farm Res.,22(3),9.

Curran J. and J. Heng. 1992. Comparison of three methodes for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. *J. Nematol*. 24: 170-176.

D'Alessandro, C. P., S. Padin, M.I. Urrutia and C.C. Lopez Lastra. 2011. Interaction of fungicides with the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Science and Technology.* Vol.21, Nos. 1-2, January-February. pp. 189 – 197.

De Barjac, H., and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga. 35:233-240.

Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their Potential for pest control. pp. 193-222. *In* : H.D. Burges (ed.) Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London.

Dunkle, R. L.,and B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* : a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol. 17: 120-126.

Dutky, S.R., J.V. Thomson and G.W. Cantwell. 1964. Technique for the propagation of the DD-136 nematode. Journal of Insect Pathology 6 ; 417-422.

El-Guidny, M.A., Madi, S.M., Keddis, M.E., Issa, Y.H. and Abdel-Sattar, M.M. 1982.Development of resistance to pyrethroids in field populations of the EgyptianCotton Leafworm *Spodoptera litturalis* (Boisd.). International Pest Control 124 : 6-11.

Entwisetle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, p.186-201 *In* Insect viruses and pest management edits : Frances R. Hunter-Fujita, Philip F. Entewistle, Hugh F. Evans and Norman E. Crook.

Entwistle, P. F., J. S. Cony, M. J. Bailey and S. Higgs. 1993. Bacillus thuringiensis, and Environmental Biopesticide: Theory and Practice. 239-267.

Friendman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-173. *In*: Gaugler, R.A., and Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological control. Boca Raton, Florida CRC Press

Goodey, J.B. 1963. Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes. Tech. Bull. No. 2. Her Majesty^s Stationary Office, London. 72 p.

Grewal. P.S. and P.N. Richardson. 1993. Effect of application rate of *Steinernema feltiae* (Nematoda : Steinernematidae) on control of the mushroom sciarid fly *Lycoriella auripila.* Biocontrol Science and Technology 3:29-40.

Grewal. P.S. and Smith C. 1995. Insect-Parasitic Nematodes for Mushroom Pest Control. Mushroom News : April : 15-25.

Grewal. P.S., P.M. Tomalak., C.B.O. Keil and Gaugler. 1993. Evaluation of generally selected strain of *Steinernema feltiae* against the mushroom *Lycoriella auripila.* sciarid. Ann. appl. Biol. 123:695-702

Gudauskas, R. T. and D. Canerday. 1968. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration and ultraviolet and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis viruses. J. Inverterbrate pathol. 12 (3): 405-411.

Hatsukade, M. 1994. Control of turf grass insect pests with entomopathogenic nematodes in Japan. In Food&Fertilizer Technology Center. Technical bulletin 139:15-21

Hazir S., S.P. Stock, H. K. Kaya, A.M. Koppenhofer, and N. Keshin. 2001. Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Invertebrate Pathology 77 : 243-250.

Herbert B. Scher. 1999. Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides. Marcel Dekker, Inc. new York. 329 pp.

Hofte, H. and H.R. whiteley. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbial. Rev. 53 : 242-25.

Huang, Z., F. Sahar, S. Ren and S. Ali. 2010. Effect of *Isaria fumosoroseus* on *Eretmocerus* sp. nr. *Furuhashii* (Hymenoptera: Aphelinidae), a Parasitoid of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pakistan J. Zool*., vol. 42(2), pp. 121 – 127.

Hunter-Fujita, F.R., Enteistle, P.F., Evans,H.F. and Crook, N.E. 1998. Insect Viruses and Pest Management. John Wiley & Sons, Inc., New York. 620 p.

Ignoffo,C. M. and O. P. Batzer. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *J. Econ. Etomol*. 64: 850-853.

Jaques, R.P. 1972. Control of the cabbage looper and the imported cabbage-worm by viruses and bacteria*. J. Econ. Entomol*., 65, 757-760.

Jaques, R.P. and Laning, D.R. 1978. Efficacy of mixtures of *Bacillus thuringiensis*, viruses and chlordimeform against insects on cabbage. Can. Entomol., 110, 443-449.

Kaya, H.K. 1990. Soil ecology, pp. 93-111 *In*: Gaugler, R.A., and Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological control. Boca Raton, Florida CRC Press.

Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology, pp. 281-324. *In*: *Manual of Techniques in Insect Pathology* L.A. Lacey, (ed). Biological Techniques Series, Academic Press, San Diego.

Kerry, B.R. 1987. Biological Control. pp. 233-263. *In* R.H. Brown and B.R. Kerry. (eds.). Principle and Practice of Nematode Control in Crop. Academic Press, Sydney.

Kershaw, M.J., E.R. Moorhouse, R. Bateman, S.E. Reynolds and A.K. charnley. 1999. The role of destruxins in pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. J. Invertebr. Pathol. 74: 213-223.

Klein, Michael. G., 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pest. , pp. 195-210. *In*: Gaugler, R.A., and Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological control. Boca Raton, Florida CRC Press

Kung, S.P., R. Gaugler, and H.K. Kaya. 1991. Effect of soil tempeature,moisture and rerative humidity on entomopathogenic nematode persistance. Journal of Invertebrate Pathology 57: 242-249.

Lezama-Gutiérrez , R., A. Trujilo-De la Luz, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo-Dominguez, A.R. Pescador, M. López-Edwards and M. Aluja. 2000. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on Anastrepha ludens (Diptera: Tephritidae): Laboratory and Field Trials. J. Econ. Entomol. 93: 1080-1084.

Luttrell, R.G., S.Y. Young, W.C. Yearian and D.L. Horton. 1982. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* spray djuvant-viral insecticide combinations against *Heliothis* spp.(Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 11: 783-787.

Lynn, D.E. 2001. Novel techniques to establish new insect cell lines. In Vitro Cell. 37:319-321.

Matthews, G.A. 1984. Pest management. Longman Inc. New York. 231 pp.

McEwen, F.L. and Hervey, G.E.R. 1959. Microbial control of two cabbage insects. *J. Insect Pathol*., 1, 86-92.

Mcvey, J.R., Gudauskas, R.T. and Harper, J.D. 1977. Effects of *Bacillus thuringiensis* and nuclear polyhedrosis virus mixtures on Trichoplusia ni larvae. *J. Invertebr. Pathol*., 29, 367-370.

Miller, R. W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for Steinernema and Heterorhabditis Entomopathogenic nematodes. J. Nematol. 21:574.(abstr.)

Molyneux, A.S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* spp. at various temperature and their subsequent infectivity for insect. Rev. Nematol. 8 : 165 – 170.

Montgomery, D.C. 2005. Design and analysis of experiments. 6th ed. John Wiley & Sons.Inc. USA

Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. 1995. Virus taxonomy: Sixth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Springer-Verlag, New York.

Notarte, A. and D.J. Merritt 2001. Successful in vitro rearing of *Trichogramma australicum* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) on artificial diet containing cultured insect cells, Bulletin of Entomological Research 91 (3) : 227-231

Oatman, E.R., Hall, I.M., Arakawa, K.Y., Platner, G.R. Bascom, L.A. and Beegle, C.C. 1970. Control of the corn earworm on sweet corn in southern California with a nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol*., 63, 415-421.

Okada, M.1981. Utilization and Mass Production of *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus for control of the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius

Poinar, G. O. and G. M. Thomas. 1966. Significance of Achromobacter nematophilus Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (Neoaplectana sp., Steinernematidae). J. Parasitol. 56:385-390.

Poiner, G.O. and G.M. Thomas 1965. A new bacterium, *Achromobacter nematophilus* sp. NOV (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) associated with a nematode. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy Vol. 15: 4, 249-252.

Popiel I. and E.M. Vasquez. 1991. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Nematol*. 23: 432-437.

Porcar, M. and P. Caballero. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. J. Appl. Microbiol. 89(2): 309-316.

Richardson. P.N. and P.S. Grewal. 1991. Comparative assessment of biological (Nematoda: *Steinernema feltiae*) and chemical methods of control for the mushroom fly *Lycoriella auripila* (Diptera: Sciaridae). Biocontrol Science and Technology. 1:217-228.

Rosa, W. DE LA, R. Alatorre, J.F. Barrera and C. Toriello. 2000. Effect of Beauveria bassiana and *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) upon the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae) under field conditions. J. Econ. Entomol. 93: 1409-1414.

Ruales C. 1997. The Use of Entomopathogenic Fungi for the Control of Coffee Berry Borer in Nicaragua. Coffee & Cocoa: News. Vol. 2 (2): 3 – 7 pp.

Sandhu, S.S., A.K. Sharma, V. Beniwal, G. Goel, P. Batra, A. Kumar, S. Jaglan, A.K. Sharma and S. Malhotra. 2012. Myco-Biocontrol of Insect Pests: Factors Involved, Mechanism, and Regulation. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Pathogens*. Vol. 2012, Article ID 126819, 10 pp.

Sasnarukkit, A., R. Gaugler and S. Sontirat. 2002. Effects of the entomopathogenic nematode,*Steinernema siamkayai* and its bacterial symbiont's metabolites on root knot nematode, *Meloidogyne incognita.* The First International Conference on Tropical and SubtropicalPlant Diseases, November 5-8, 2002. The Imperial Mae Ping Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Steinhaus, E. A. 1949. Principles of Insect Pathology. McGraw-Hill Book, New York.

Stelzer, M.J., 1965. Susceptibility of the great basin tent caterpillar, Malacosoma fragile (Stretch) to a nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol*., 7, 122-130.

Stelzer, M.J., Neisess, J. and Thompson, C.G. 1975. Aerial applications of a nuclear polyhedrosis virus and *Bacillus thuringiensis* against the Douglas fir tussock moth, *Orgyia psendosugata. J. Econ. Entomol*., 68, 269-272.

Stock, S.P., V. Somsook and A.P. Reed. 1998. *Steinernema siamkayai* n. sp. Rhabditida : Steinernematidae), an entomopathogenic nematode from Thailand. Systematic Parasitology 91 : 105-113.

Tanada, Y and H.K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic press, Inc. 666 p.

Triantaphyllou A.C. and E. McCabe. 1989. Efficient preservation of root-knot and cyst nematode in liquid nitrogen. *J. Nematol*. 21: 423-426.

Vega-Aquino, P., S. Sanchez-Pena and C.A.Blanco. 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens Nomuraea rileyi and Isaria tenuipes against lepidopterous larvae. *J. Invertebr. Pathol*. 103: 145 – 149.

Vey,A., J. N. Quiot , I. Mazet and C.W. McCoy. 1993. Toxicity and Pathology of Crude Broth Filtrate Produced by *Hirsutella thompsonii* var. thompsonii in shake culture. J. Inverteb. Pathol. 61 : 131-137.

White W. and K.L. Wharton. 1984. Development of a cryogenic preservation system. *Am. Lab*. June: 65-76.

Wongwilikhit, S., K. Ukoskit, M. Mingmuang, A. Thongpan and V. SomSook. 2008. A rapid detection and identification of Thai Nucleopolyhedrovirus using PCR-based typing. In International seminar : Bio Agricultural Input for Sustainable Agriculture Prospects and Challenges. July 1-2, Medan, Indonesia.

Wraight, S.P., M.A. Jackson and S.L. de Kock. 2001. Production, stabilization and formation of fungal biocontrol agents. Pages 253-287. In: T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds.). Fungi an biocontrol agents progress, problems and potential. CABI publishing. 390 pp.

เอกสารอ้างอิงกิจกรรมที่ 3

กรมวิชาการเกษตร. 2547. เอกสารวิชาการกล้วยไม้. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 152 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ทะเบียนเกษตรกรผู้ปลูกกล้วยไม้เพื่อการส่งออกปี 2544. กลุ่มไม้ดอกไม้ประดับกองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 655 หน้า.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2549. สถิติปริมาณการเพาะปลุกพืชผัก ปีการผลิต 2548/2549. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านการเกษตร. แหล่งที่มา : http://production.doae.go.th/estimate/report P2_display.php, 15 พฤศจิกายน 2553

กรมอนามัย. 2535. ตารางแสดงคุณค่าโภชนาการของหารไทย. หน้า 108. ใน: มหัศจรรย์ผัก. มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.

กองกีฎและสัตววิทยา. 2537. ปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้น กสิกร 67 (6) : 522 – 524.

เกษม สร้อยทอง. 2533. ประสิทธิภาพของรา Chaetomium cochliodes และ Chaetomium curiculorum ในการป้องกันโรคไหม้ข้าว (Rice Blast) สาเหตุจากเชื้อ Pyricularia oryzae.แก่นเกษตร. 18 (2) : 89 – 96.

เกษม สร้อยทอง. 2532. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. คณะเทคโนโลยีการอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง. 326 หน้า.

จิตรา เกาะแก้ว เลขา มาโนช จีรพันธ์ วรพงษ์ นิพนธ์ วิสารทานนท์ ณรงค์ สิงห์บุระอุดม อำนาจ เอี่ยมวิจารณ์ และวรวรรณ ปุณณะตระกูล. 2550. ราเอนโดไฟท์ในพืชสมุนไพรและการศึกษาการเป็นปฏิปักษ์ต่อราสาเหตุโรค พืชในห้องปฏิบัติการ. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (1): 571-578.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2534. การควบคุมโรคพืชโดยชีววิธี. เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการหลักสูตร การควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.หน้า 1-13. ระหว่างวันที่13-17 พฤษภาคม 2534 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.

จิระเดช แจ่มสว่าง จินตนา ชนะ วรรณวิไล เกษนรา เฉลิมลาภ จิระประสิทธ์ สุพรรณี ชีววิริยกุล ธีรยุทธ ตู้จินตา ศรปราชญ์ ชไนศวรรยางกุล วุฒิชัย ญาณอรรถ กัทลีวัลย์ สุขช่วย และสมนึก กายาผาด. 2535. การควบคุมโรคต้นแห้งของข้าวบาร์เลย์โดยวิธีคลุกเมล็ด ด้วยผงมวลชีวภาพของเชื้อรา Trichoderma harzianum ข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและปลูกพืชทดลอง. 6(2) : 3 – 8.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล รัศมี ฐิติเกียรติพงศ์ และ บุษราคัม อุดมศักดิ์. 2551. พัฒนาสูตรสำเร็จแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวในขิง. รายงานผลการวิจัยประจำปี 2551. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล วิภาดา ทองทักษิณ และสุธามาศ ณ น่าน. 2551. การควบคุมโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียของปทุมมาโดยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์. *ใน* รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัยปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 2049-2059.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รัศมี ฐิติเกียรติพงษ์ , อรพรรณ วิเศษสังข์ และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2548. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 90-105. ใน: รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2548 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, วงศ์ บุญสืบสกุล, อรพรรณ วิเศษสังข์ และ ทัศนาพร ทัศคร. 2547. การศึกษาการใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคเหี่ยวของขิงและมะเขือเทศ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2547. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 115-126.

ทัศนาพร ทัศคร และ พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2552. โรคยางไหลในแคนตาลูป. จดหมายข่าวผลิใบ ปีที่12 ฉบับที่ 3 ประจำเดือน เมษายน 2552. หน้า 2 - 3.

ธารทิพย ภาสบุตร, ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี, อภิรัชต์ สมฤทธิ์ และทิพวรรณ กันหาญาติ.2557. การทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum capsici* (Syd. & P. Syd.) Butl. & Bisby สาเหตุโรคแอนแทรคโนสพริก. หน้า 540-546. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม 2557. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

นิตยา กันหลง. 2545. สมุดภาพโรคสำคัญของพืชตระกูลหอมและกระเทียมในประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 32 หน้า.

นิตยา กันหลง. 2545. โรคสำคัญของพืชสกุลหอมและกระเทียมในประเทศไทย. เอกสารวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 96 หน้า

นิพนธ์ ทวีชัย. 2533. นิเวศวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. ใน: เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร.

นิพนธ์ ทวีชัย. 2538. งานวิจัยในปัจจุบันด้านการใช้แบคทีเรียบางชนิดควบคุมโรคพืชโดยวิธีชีวภาพ. หน้า 118-129. *ใน* เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยและกรมวิชาการเกษตร

นิยมรัฐ ไตรศรี. 2544. คู่มือโรคไม้ดอกไม้ประดับและการป้องกันกำจัด. โรงพิมพ์คุรุสภาลาดพร้าว. กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

นิรนาม (ไม่ระบุปี พ.ศ.) สืบค้นจาก www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/04-plant/.../plant_00.html -) เมื่อ 25 สิงหาคม 2552

นิราวดี ศรีสุวรรณ, เอกชัย ปฐมสุริยะพร และ เอกพันธ์ บางยี่ขัน (ไม่ระบุปี พ.ศ.). คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร สืบค้นจาก http://www.scisoc.or.th/stt/32/sec_b/paper/stt32_B2_B0104.pdf) เมื่อวันที่ 26 สิงหาคม 2552

นุชนารถ จงเลขา. 2546. คู่มือการควบคุมโรคและศัตรูต่างๆของพืชผักแบบผสมผสาน. สำหรับเจ้าหน้าที่ส่งเสริมผักบนที่สูง. ศูนย์อารักขาพืช มูลนิธิโครงการหลวง 163 หน้า.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Fusarium* สาเหตุโรคเหี่ยวในมะเขือเทศและแตงกวา. หน้า 210-211.*ใน* การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ (บทคัดย่อ) ครั้งที่ 8, 20-22 พฤศจิกายน 2550 ณ โรงแรมอัมรินทร์ลากูน องเมือง จ. พิษณุโลก

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 896-913. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อสาเหตุโรคพืช : ศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่มี

ศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ. หน้า 896-913. *ใน* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2550 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2549. ศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ที่ มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ. บทคัดย่อ/รายงานความก้าวหน้า ปี 2549 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 234.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2550. ศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกลุ่ม Bacillus ที่ มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชเศรษฐกิจ. ผลงานวิจัยประจำปี 2550 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1342-1355.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2553. การพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เอ็นโดสปอร์ *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคเหี่ยวของขิง. หน้า 988 -1005 . ใน*:* รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

บุษราคัม อุดมศักดิ์, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, สุรีย์พร บัวอาจ, บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ และ รสสุคนธ์ รุ่งแจ้ง. 2557. พัฒนาแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ใหม่ ในการควบคุมโรคใบจุดคะน้า สาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola.* หน้า 1- 16. *ใน* ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการ เกษตร. ประจำปี 2557 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 224 หน้า .

บูรณี พั่ววงษ์แพทย์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และ วงศ์ บุญสืบสกุล. 2554. การคัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ในการควบคุม *Ralstonia solanacearum* สาเหตุโรคเหี่ยวในพริก. *วารสารโรคพืช*. 25: 70-78.

ปฏิมาพร ปลอดภัย,เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ วสันณ์ เพชรรัตน์.2551. การใช้เชื้อ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อราบางชนิดโดยชีววิธี. หน้า 185-188. ใน: วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 39(3) (พิเศษ) : แหล่งที่มา: http://www.agi.nu.ac.th/proceeding/Oral/3.CO%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%82%E0%B8%B2%E0%B8%9E%E0%B8%B7%E0%B8%8A%E0%B8%9C%E0%B8%B1%E0%B8%81/CO_185_188.pdf, วันที่ 14 พ.ค.2555)

ปัญญรัตน์ สาลี. 2536. การใช้ *Trichoderma hamatum* (Bonard.) Bain ควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, บทคัดย่องานวิจัย ของนักศึกษาปริญญาตรี ปีการศึกษา 2536. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพฯ. หน้า 350-351.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และจงวัฒนา พุ่มหิรัญ. 2551. การศึกษาโรคกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. *ใน* รายงานความก้าวหน้าผลงานวิจัย ปี 2551 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1840-1856.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ สุรีย์พร บัวอาจ อัจฉรา พยัพพานนท์ และดวงพร อมัตรัตนะ. 2553. การควบคุมโรคใบจุดเหลืองของกล้วยไม้สกุลแวนด้าโดยชีววิธี. หน้า 2390-2402. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ และสุรภี กีรติยะอังกูร. 2548. หน้าวัว. หน้า 62 – 73. *ใน* เอกสารวิชาการโรคไม้ดอก สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

พรพิมล อธิปัญญาคม. 2552. โรคใบจุด.หน้า 93-94. ใน: คู่มือโรคผัก สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

พัฒนา สนธิรัตน ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน ธนวัฒน์ กำแหงฤทธิรงค์ วิรัช ชูบำรุง และ อุบล คือประโคน. 2537.ดรรชนีโรคพืชในประเทศไทย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, 285 หน้า

พัฒนา สนธิรัตน วิรัช ชูบำรุง ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และปิยะ เกียรติก้อง. 2526. เชื้อรา *Alternaria* เป็นสาเหตุโรคใบจุดของพืชผักบางชนิด. วารสารโรคพืช ปีที่ 3 เล่มที่ 4. ต.ค.-ธ.ค. 2526. น. 154-167.

พากเพียร อรัญนารถ, นงรัตน์ นิลพานิชย์, วิชิต ศิริสันธนะ และ สมคิด ดิสถาพร. 2544. ประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว.วารสารวิชาการเกษตร.ม.ค.-เม.ย. 2544, 19(1) หน้า 4-12.

พิภพ ลำยอง. 2544. การควบคุมโรคกุ้งแห้งของพริก (*Colletotrichum* spp.) โดยใช้ endophytic microorganism ที่ แยกได้จากสมุนไพรไทย (Control of anthracnose disease of chili peper (*Colletotrichum* spp.) by endophytic microorganism isolated from Thai medicinal plants). เชียงใหม่ : ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 55 หน้า.

พีระวรรณ พัฒนวิภาส. 2546. โรคกาบและใบไหม้ข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* . หน้า 260-263. ใน : รายงานการประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ 31. 11-15 พฤษภาคม 2546. ณ โรงแรมโรสการ์เดนท์ เอไพรม รีสอร์ท อ. สามพราน จ. นครปฐม.

ภมรทิพย์ อักษรทอง .2546. เชื้อราปฏิปักษ์ต่อไส้เดือนฝอยในเขตภาคเหนือของประเทศไทยภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

มนตรี เอี่ยมวิมังสา และจรัส ชื่นราม. 2534. ความสัมพันธ์ระหว่างไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita* และไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์ม *Rotylenchulus reniformis* กับพริกห้วยสีทน-1. หน้า 68-74. ใน: รายงานผลงานวิจัย 2534. กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

มนตรี เอี่ยมวิมังสา. 2538. เอกสารวิชาการ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืช . กรมวิชาการเกษตร 190 น.

วงศ์ บุญสืบสกุล, วิวัฒน์ ภานุอำไพ, ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล, รุ่งนภา คงสุวรรณ์ และ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์จากเชื้อ *Bacillus subtillis* ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง รายงานผลการวิจัยประจำปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กทม. 22 หน้า.

วรรณวิไล อินทนู จิระเดช แจ่มสว่าง และวราภรณ์ สุทธิสา. 2548. การควบคุมโรคใบจุดคะน้าสาเหตุจากเชื้อรา *Alternaria brassicicola* ด้วยชีววิธีด้วยจุลินทรีย์ปฏิปักษ์. หน้า 123-130. ใน: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 40 สาขาพืช.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2546. ราวิทยาเบื้องต้น. จามจุรี โปรดักส์, กรุงเทพฯ. 351 หน้า

วิรัช ชูบำรุง, ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน และพัฒนา สนธิรัตน. 2528. *Colletotrichum* spp. ในประเทศไทย. น.128-140. *ใน* รายงานผลงานวิจัย พ.ศ.2528 กลุ่มงานวิทยาไมโค กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

ไวรุจน์ เดชมหิทธกุล, จันทร์จีรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และ เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. 2550. การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. หน้า 251-259. ใน: วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ.,ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน.

ศศิธร วุฒิวณิชย์. 2547. ประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Erwinia carotovora* subap. *carotovora* เชื้อสาเหตุโรคเน่าเละของผัก. วิทยาสารกำแพงแสน 2: 72-81.

ศิริพงษ์ คุ้มภัย และพรพิมล อธิปัญญาคม.2554. โรคแอนแทรคโนสพริก. หน้า 3-4. *ใน* คู่มือโรคผักและการป้องกันกำจัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ศุภพงศ์ ภูวพัฒนะพันธุ์; ประชา ลี้ประเสริฐ; วิจัย รักวิทยาศาสตร์ สืบศักดิ์ สนธิรัตน .2537.เชื้อราที่ใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปม (Meloidogyne spp.) โดยใช้เชื้อรา Paecilomyces spp. และ Verticillium spp. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 212 น.

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร. 2544. สถิติการค้าสินค้าเกษตรกรรมไทยกับต่างประเทศปี 2544. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

สมควร คีรีวัลย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และบัญชา ชิณศรี. 2537. ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของ *Rotylenchulus reniformis* ในทานตะวัน. หน้า 54-59. ใน: รายงานผลงานวิจัย 2537. กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

สมควร คีรีวัลย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ยุทธศักดิ์ เจียมไชยศรี และบัญชา ชิณศรี. 2538. ความสามารถในการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *Rotylenchulus reniformis* กับถั่วเขียว. หน้า 26-29. ใน: รายงานผลงานวิจัย 2538. กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

สมศิริ จิ๋วสกุล. 2521. เซรุ่มวิทยาการถ่ายทอดโรคทางเมล็ดของโรคแอนแทรคโนสของพริกและประสิทธิภาพของสารเคมีควบคุมโรคบนใบ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ประชาศรัยสรเดช. 2517. การศึกษาอนุกรมวิธานและพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยเรนิฟอร์มของพลู. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 69 หน้า.

สุณีรัตน์ สีมะเดื่อ พรพิมล อธิปัญญาคม และอภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2551. สำรวจ รวบรวม จำแนก และศึกษาพืชอาศัยของรา *Sclerotium spp.*สาเหตุโรคพืช. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการ เกษตร.

สุรีย์พร บัวอาจ ปิยรัตน์ ธรรมกิจวัฒน์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล บุษราคัม อุดมศักดิ์ และรุ่งนภา คงสุวรรณ์. 2553. คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีศักยภาพในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* และ *E. chrysanthemi* สาเหตุโรคเน่าเละกล้วยไม้. หน้า 857-884. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

เสมอใจ ชื่นจิตต์ วสันณ์ เพชรรัตน์ และพรศิลป์ จันทวีเมือง. 2551. การประเมินการควบคุมโรคใบไหม้ของหน้าวัวด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์. *ว. วิทยาศาสตร์การเกษตร* 39: 195-198.

เหลืองพังงาน (นามแฝง). 2552. ปัญหาโรคเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. วารสารข่าวสมาคมชาวสวนกล้วยไม้. 8: 6-9.

อมรรัตน์ ทัศนกิจและมณจันทร์ เมฆธน. 2539. การศึกษาความเป็นพิษของชีวภัณฑ์ประเภทแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AP-01 และ B. subtilis AP-04 สำหรับป้องกันกำจัดโรคพืชในหนูถีบจักร. หน้า 99-104 *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 30 มกราคม - 1 กุมภาพันธ์ 2539, กรุงเทพฯ

อมรรัตน์ ภูไพบูลย์. 2552. รา Phytophthora สาเหตุโรคพืชในประเทศไทย. เอกสารวิชาการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช . 74 หน้า

อรพรรณ วิเศษสังข์. 2552. คู่มือการเลือกใช้สารป้องกันกำจัดโรคพืช. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

อัจฉรา พยัพพานนท์. 2545. เห็ดสกุล *Oudemansiella* จะเป็นเห็ดพาณิชย์. วารสารเห็ดไทย 2545 :45-55.

Abd-El-Moity, T.H, M.L Abed –El- Moneim, M.M.M. Tia, A.Z. Aly, M.R.A. Tohomy. 2009. Biological Control of some cucumber diseases under organic agriculture. เข้าถึงข้อมูลวันที่ 1 ก.ย. 2552 : http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrarnr=608_28

Abeysinghe, S. 2007. Biological control of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01. RUHUNA JOURNAL OF SCIENCE Vol. 2, September 2007,pp. 82-88. http://www.ruh.ac.lk/rjs/rjs.html

Adiko, A. and S.R. Gowen. 1999. Effects of spores of *Pasteuria penetrans* on the motility of second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*. Russian Journal of Nematology 7:5–6.

Ali D.D., P.M. Ali, B.A. Ghaffar and M.S. Ahmed. 2005. The effect of different initial densities of nematode (*Meloidogyne javanica*) on the build-up of *Pasteuria penetrans* population. Journal of Zhejiang University SCIENCE 6B:113-118.

Anke T., Werle A., Bros M., and Steglich W. 1990.Antibiotics from basidiomycetes XXXIII.Oudemansin X, A new antifungal F-β-methoxyacrylate from *Oudemansiellaradicata* (Relhan ex Fr.) sing. *J Antibiotics*XLIII(8):1010–1011.

Anke, T. and Werle, A.1991. Antibiotic from basidiomycetes (XXXIII).Oudemansin X, a new antifunfal E-β-methoxy acrylate form *Oudermansiellaradicata*. *J. Antibiotics*43:1010-1011.

Anke, T., Besel, H., Mocek, U., and Steglich, W.1983. Antibiotics from basidiomycetes XVIII.Strobilurin C and oudemansin B, two new antifungal metabolites from Xelura species (Agaricales).*J. Antibiotics*36:661-666.

Aspiras, R.B. and A.R. de la Cruz. 1985. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*, pp. 89-92. *In* G.J. Persley. Bacterial Wilt Disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Bannos, Philippines

Aycock, R. 1966. Stem Rot and Other Diseases Caused by *Sclerotium rolfsii*. Tech. Bul. No. 174. North Carolina Agr. Exp. Sta. 202 pp.

Aysan, Y., A. Karatas,. and O. Cinar. 2003. Biological control of bacterial stem rot caused by *Erwinia chrysanthemi* on tomato. Crop Protection V. 22 (6), 807-811.

Baker, K.F. and Cook, R.J. 1974. Biological Control of Plant Pathologens, W.H. Freeman and Company, USA. 433 p.

Barnett, H.L. and B. B. Hunter. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Ed., The American Phytopathological Society,.Minnesota. 218 pp.

Barron, G. L. 1977. The nematode-destroying fungi. Canadian Biological Publications. Ontaria, Canada. 140 pp.

Belanger, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. Crop Science 36: 460-462.

Benhamou, N., C. Garand, and A. Goulet. 2002. Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo47 To Induce Resistance against *Pythium ultimum* Infection in Cucumber. Applied and Environmental Microbiology 68 (8): 4044-4060.

Cavaglieri, L., J. Orlando, M.I. Rodríguez, S. Chulze and M. Etcheverry. 2005. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. Research in Microbiology 156 (5-6): 748-754.

Celino, M.S. and D. Gotllieb. 1952. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa*. Phytopathology. 42: 4. (Abstract).

Chanway, C.P. 1998. Bacterial endophytes: ecology and practical implication. Sydowia 50: 149-170.

Chen, Z. X., D. W. Dickson, L. G. Freitas and J. F. Preston. 1997. Ultrastructure morphology, and sporogenesis of *Pasteuria penetrans*. Phytopathology 87:273-283. Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology,Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology 30:313-340.

Chen, Z.X. and D.W. Dickson. 1998. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology,Ecology, and Biological Control Potential. Journal of Nematology 30:313-340.

Chen, Z.X., D.W. Dickson, R. McSorley, D.J. Mitchell, and T.E. Hewlett. 1996. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. Journal of Nematology 28:159-168.

Chunram, C. 1972. A list of plant parasitic nematodes in Thailand. Plant Protection Service. Tech. Bull. No. 1. The Plant Industry Division, Ministry of Agriculture and Co-operatives. Bangkok. 44 p.

Chutima Kuekulvong. 2008. Antifungal activity against *Sclerotium rolfsii* by antagonistic microorganisms isolated from soil and *Dendrobium* orchid. Ph.D. Mahidol University.

Clay, L. 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses: their potential as Biocontrol Agents. Mycological Research 92:1-12.

Cook, R.J. 1985. Biological control of plant pathogens: theory of application. Phytopathology 75: 25-29.

Cook, R.J. and Baker, K.F. 1983. The Nature of Practice of Biological of Plant Pathogens. The American Phytopathology Society, St. Paul, Minnesota. 539 p.

Czaczyk, K., K. Trojanowska, and B. Stachowiak. 2002. Inhibition of Ergosterol Biosynthesis in Fungal Plant Pathogens by *Bacillus* sp. Polish Journal of Environmental Studies 11 (5): 593-597.

Da Silva, J. C., andW. Bettiol. 2005. Potential of Non-Pathogenic *Fusarium oxysporum* Isolates for Control of Fusarium Wilt of Tomato. Fitopatologia Brasileira 30:409-412.

Dackman, C., Jansson, H.B. and B., Nordbring-Hertz 1992. Nematophagous fungi and their activities in soil. In:Soil Biochemistry. (eds. G. Stotzky and J.M., Bollag), MarcelDekker, New York: 95-103.

Dalmacio , S.C ., Lozano , G.P., De La Pena , R. S., Candole , B. L. 1990. Mechanical , Biological and Chemical control of banded leaf and sheath blight on maize caused by *Rhizoctonia solani* (Philippines Bacolod City (Philippines).

Denisova, N.P. 2001. Traditional of using medicinal mushroom in different nations. Int. J. Med. Mushr. 3:409-415.

El-hamshary, O.I.M., and A.A Khattab. 2008. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and Their Fusants Against *Fusarium solani*. Research Journal of Cell and Molecular Biology, 2(2): 24-29.

Environment Protection Agency . แหล่งที่มา: WWW.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm., 28 พฤศจิกายน 2557

Farr, D.F., G.F. Bills, G.P. Chamuris, and A.Y. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. American Phytopathological Society., St. Paul, Minnesota.

Fiddaman, P. J. and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*, J. Appl. Bacteriol. 76 (4), 395-405.

Gasoni, L., Stegman, D.G.B. and Fortugo, C. 1993. Suppression of damping-off causedby *Rhizoctonia solani* through a nonpathogenic sterile septate fungus. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 100: 467-473.

Gowen, S, K.G. Davies and B. Pembroke. 2008. Potential use of *Pasteuria* spp. in the management of plant parasitic nematodes. Pp. 205-219 *in* Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes. Ciancio, A. and K.G. Mukerji, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Gray, N. F. 1985. Ecology of nematophagous fungi: effect of soil moisture, organic matter, pHand nematode density on distribution. Soil Biol. Biochem. 17: 499-507.

Guo, J., H. Qi and S. Li. 2002. Biocontrol efficiency of three PGPR strains admixture to Pepper bacterail wilt. Bacterial Wilt Newsletter. 17: 3.

Hao,Y.,Mo,M.,Su,H.and K,Zhang. 2005. Ecology of aquatic nematode-trapping hyphomycetes in southwestern China.Aquatic Microbiology Ecology. 40:175-181

Hayward, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. App. Bacteriol. 27: 265-277.

Hewlett, T. E., J. F. Gerber, K. S. Smith, and J.H. White. 2002. *In Vitro* Culture of *Pasteuria penetrans*. Nematology 4:152-153.

Hewlett, T.E., S.R. Stetina, L.M. Schmidt, J.P. Waters, L.J. Simmons and J.R. Rich. 2009. Identification of *Pasteuria* spp. that parasitize *Rotylenchulus reniformis*. Journal of Nematology. 41:338.

Hewlett, T.E., S.T. Griswold, and K.S. Smith. 2006. Biological control of *Meloidogyne incognita* using in-vitro produced *Pasteuria penetrans* in a microplot study. Journal of Nematology 38:274 (Abstract).

Hussey, R. S., and H. R. Boerma. 1981. A greenhouse screening procedure for root-knot nematode resistance in soybeans. Crop Sci. 21:794-796.

Jansson, H.B., and L.V.,Lopez-Llorco.2001.Biology of nematophagous fungi. In J.D.Misrha&B.W.HornZ Eds.),Tricomyces and other fungal group : Professor Robert

W.Lichwardt commemoration volume(pp.145-173)Ennfield,NH :Science Publisher.Inc.

Karuna, K., A.N.A. Khan and M. R. Ravikumar. 1997. Potential of biocontrol agent in the management of bacterial wilt of Tomato caused by *Ralstonia solanacearum.* Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Kerry, B. R., and B. A. Jaffee. 1997. Fungi as biological control agents for plant parasitic nematodes. in The Mycota K. Esser and P. A. Lemke, eds., Vol. IV, pp. 204-218. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.

Khaithong, T., M. Iemwimungsa, T. Sarapat and P. Thammakijjawat. 2012. Collection of *Pasteuria penetrans* in Thailand. Page 133. In : The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases. Feb. 7-10, 2012. Chiang Mai, Thailand.

Kupper, K.C., N.G. Fernandes and A.de Goes. 2003. Biological control of Colletotrichum acutatum, causal agent of citrus postbloom fruit drop disease. Fitopatologia Brasileira 28: 251-257.

L. M., L. J. Smith, and E. A.B. Aitken. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. Mycological Research 110 (8): 929-935.

Larkin, R. P. 1996. Suppression of Fusarium Wilt of Watermelon by Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and Other Microorganisms Recovered from a Disease-Suppressive Soil. Phytopathology 86:812-819.

Miller, J.W. 1990. Bacterial brown spot of orchid caused by *Pseudomonas cattleyae.* Plant Pathology Circular 330.

Mordue, J.E.M. 1971. CMI.Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No.317.

Nel, B., C. Steinberg,, N. Labuschagne, and A. Viljoen. 2006. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. Plant Pathology 55 (2) : 217-223.

Oostendrop, M., D.W. Dickson and D.J. Mitchell. 1991. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. Journal of Nematology 23:58-64.

Paul, A., Backman and Richard, A., Sikora. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control (Online). Available : URL : http://www.worldcocoafoundation.org/scientific-research/research-library/documents/Backman2008D.pdf [2009 August 26]

Pratella, G. C., and M. Mari. 1993. Effectiveness of *Trichoderma*, *Gliocladium* and *Paecilomyces* in postharvest fruit protection. Postharvest Biology and Technology 3 (1): 49-56.

Rafaeli Rocha, Daniela Eleuterio da Luz, Cibele Engels, Sonia Alvim Veiga Pileggi, David de Souza Jaccoud Filho, Rodrigo Rodrigues Matiello and Marcos Pileggi. 2009. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for *in vitro*

biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.). Brazilian Journal of Microbiology 40: 73-78.

Reshetnikos, S.V., Wasser, S.P. and K.K. Ton. 2001. Higher basidiomycotota as a source jof antitumor and immunostimulation polysaccharides (Review). Int. J. Med. Mushr. 3:361-394

Robinson, A.F., R.N. Inserra, E.P. Caswell-Chen, N. Vovlas and A. Troccoli. 1997. *Rotylenchulus* species: identification, distribution, host ranges, and crop plant resistance. Nematropica 27 (2): 127-180.

Rosa, L.H., Cota, B.B., Machado, K.M.G., Rosa, C.A., and Zani, C.L.2005. Antifungal and other biological activities form *Oudermansiellacanarii* (Basidiomycota). *World J. of Microbiology& Biotechnology* 21(6-7):983-987. (Abstract) (Online). Available.http://www.d.wanfangdata.com.cn/NSTLQK_NSTL_QK11365412.aspx (August, 27 2009).

Sanaina, V., V. Kishore and G.S. Shekhawat. 1997. Biocontrol of bacterial wilt of potato by avirulent mutants of *Ralstonia solanacearum* and other Bactria. Proceedings of the 2nd International Bacterial Wilt Symposium, Guadeloupe 22-27 June, 1997.

Sano, Z. and J.T. Gaspard. 1995. Differences in mortality and reproduction of *Meloidogyne incognita* infected with varied amounts of *Pasteuria penetrans*. Japanese Journal of Nematology 25:129.

Schmidt, L.M., T.E. Hewlett, A. Green, L.J. Simmons, K. Kelley, M. Doroh and S.R. Stetina. 2010. Molecular and morphological characterization and biological control capabilities of a *Pasteuria* spp. parasitizing *Rotylenchulus reniformis* the reniform nematode. Journal of Nematology. 42:207-217.

Shoda, M. 2000. Bacterial control of plant disease. Biosci. Bioeng. 89: 515-521.

Shokes, F.M., Rozalski, K., Gorbet, D.W., Brenneman, T.B. and Berger, D.A. 1996. Techniques for inoculation of peanut with *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field. Peanut Science 23:124- 128.

Sinclair, J.B. 1991. Latent infection of soybean plants and seed by fungi. Plant Disease 75: 220-224.

Souza, R. M., A. R. Volpato and A. P. Viana. 2007. Field assessment of different sampling.strategies for coffee plantations parasitized by *Meloidogy neexigua*. Nematropica 37: 345-355.

Stadnik, M.J., Bettiol, W., and M.L. Saito. 2003. Bioprospecting for plant and fungus extracts with systemic effect to control the cucumber powdery mildew. J. of Plant Disease and Protection 110 (4): 383-393.

Stirling G.R. and M.F. Wachtel. 1980. Mass production of Bacillus penetrans for the biological control of root-knot nematodes. Nematologica 26:308–312.

Sudisha, J., S. R. Niranjana, S. Umesha, H. S. Prakash and H. Shekar Shetty. 2005. Transmission of seed-borne infection of muskmelon by *Didymella bryoniae* and

effect of seed treatment on disease incidence and fruit yield. Biological Control, Vol.37 Issue 2, May. P 196-205.

Summer, D.R. and N.A. Minton. 1989. Crop losses in corn induced by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 and nematodes Phytopatho. 79 (a).

Suslow, T.U. 1982. Role of root-colonizing bacteria in plant growth. Phytopathogenic Prokaryotes 1: 187-223.

Taylor, J.E., Hyde, K.D. and Jones, E.B.G. 1999. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei,* within and outside its natural geographic range. New Phytopathologist 142: 335-346.

Thangavelu, R., A. Palaniswami, and R. Velazhahan. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. Agriculture, Ecosystems & Environment 103 (1): 259-263.

Tronsmo, A. 1992. Leaf and blossom epiphytes and endophytes as biological agents of plant disease *In* Tjamos, E. C., Papavizas, G. C. and Cook, R. J. (eds). Biological control of plant disease ; progress and challenges for the future. NATO ASI series. A life sciences vol 230, Plenum Press, New York. 43-54

Tzortzakakis, E. A. and S.R. Gowen. 1994. Resistance of a Population of *Meloidogyne* spp. to Parasitism by the Obligate Parasite *Pasteuria penetrans*. Nematologica 40:258-266.

Tzortzakakis, E. A., A. G. D. R. Channer, S. R. Gowen and R. Ahmed. 1997. Studies on the Potential Use of *Pasteuria penetrans* as a Biocontrol Agent of Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.). Plant Pathology 46:44–55.

Uchida Janice. 2006. Bacterial diseases of Dendrobium. Pest Management Guidelines. (cited 21 Aug 2010) Available from: URL:http://www. extent.hawaii.edu/kbase// reports/dendrobium_pest.htm

Umali, T.E., Quimio, T.H. and Hyde, K.D. 1999. Endophytic fungi in leaves of Bambusa tuldoides. Fungi Science 14:11-18.

Vahidi, H. and F. Namjoyan. 2004. Evaluation of antimicrobial activity of *Oudermansiella* sp. (Basidiomycetes). Iranian J. of Pharmaceutical Research 2:115-117.

Vannests. J. 2009. Biological control of soft rot on calla lily and potatoes. HortNet. (cited 21 Aug 2010) Available from: URL:http://www.hortnet.co.nz.publications/science/jvann2.htm

Verdejo-Lucas , S. C. Ornat, F. J. Sorribas, and A. Stchiegel.2002. Species of Root-knot Nematodes and Fungal Egg Parasites Recovered from Vegetables in Almerı´a and Barcelona, Spain .Journal of Nematology 34(4):405–408.

Von ARX, J.A.. 1981. The Gennera of Fungi Sporulating in Pure Culture. 3rd Revised Ed., J. cramer, Kommandit Gesellschaft, Germany. 422 pp.

Wassana Kittikanokrat, Wairuj Dechmahitkul and Phenjun Mekvijitsaeng. 2005. Formulation of Bacillus subtilis TISTR 001 for Increasing Probiotic Shelf-life

(http://www.knowledge. biotec.or.th/doc_upload/200411495822.doc)
(http://www.splammo.net/bact102/102/ bacillus.html)

Whipps, M.J. 1987. Effect of media on growth and interactions between a range of soilbone grasshouse pathogens and antagonistic fungi. New Phytologist. 107: 127-142.

Xu, G.W. and D.C. Gross. 1986. Field evaluation of the interaction among *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* and potato yield. Phytophathology 76: 423-430.

YUN, C., Fang Y. and Jian-hua. G. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus Subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediatling biofilm formation, J. Environmental microbiology. Mar 2013 ; 15(3), 848-864

Zhang Yue-li, LIU Kai-qi, XIANG Mei-mei, and LIU Ren. 2004. Studies on the control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* with *Trichoderma*. Journal Of Zhejiang Unicersity, AGRICULTURE & LIFE SCIENCES 30(4).

เอกสารอ้างอิงกิจกรรมที่ 4

จรินทร์ การะนัด สมศักดิ์ กาญจนมูสิก และวลัยพร ศะศิประภา**.2536.** การศึกษาความสามารถในการแข่งขันของพืชคลุมตระกูลถั่วกับหญ้าขจรจบดอกเหลืองในสวนยาง**.**รายงานผลการวิจัยยางพารา สถาบันยาง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

จิรศักดิ์ สุจริต และสมศักดิ์ ปัญหา. 2551**.** หอยทากบกในอุทยานแห่งชาติเขานัน. โรงพิมพ์กรุงเทพจำกัด, กรุงเทพฯ. 112 หน้า.

ชนิดาพร ตุ้มปี่สุวรรณ และศักดิ์บวร ตุ้มปี่สุวรรณ. 2553**.**ความหลากชนิดและความชุกชุมของหอยทากบกบริเวณภูทอกน้อย จังหวัดหนองคาย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม**,** 29(3), 298-307.

ชมพูนุท จรรยาเพศ ทักษิณ อาชวาคม ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐและเกษม ทองทวี. 2537. หอยทากในประเทศไทย. เอกสารประกอบการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืช2537 กองกีฏและสัตววิทยากรมวิชาการเกษตรครั้งที่ **9** ณ โรงแรมแกรนด์จอมเทียนพาเลซ ชลบุรี วันที่ 21- 24 มิถุนายน 2537. หน้า 495-522.

ชมพูนุท จรรยาเพศ ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง และ ปิยาณีหนูกาฬ. 2553. ความหลากชนิดของหอยทากและทากในแหล่งสงวนชีวมณฑลสะแกราช. *ใน* รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2553. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. หน้า 2112-2125.

ชมพูนุท จรรยาเพศ. 2545**.** ทากและหอยทาก. เอกสารทางวิชาการ กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและ สัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 66 หน้า.

นิรนาม**.** 2547**.** คำแนะนำการป้องกันกำจัดวัชพืชและการใช้สารกำจัดวัชพืช.กลุ่มวิจัยวัชพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร**.** 133 หน้า**.**

ปฏิพล จำลอง ชนิดาพร ตุ้มปี่สุวรรณ และศักดิ์บวร ตุ้มปี่สุวรรณ. 2556**.**ความหลากชนิดและความชุกชุมของหอยทากบกบริเวณภูเขาหินทรายและภูเขาไฟในจังหวัดสุรินทร์. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 18 (2556) 1 : 67-81.

ปราสาททอง พรหมเกิด ชมพูนุท จรรยาเพศ .2552. หอยศัตรูพืชเศรษฐกิจในประเทศไทย เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร แมลง- สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 14 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร. 42-64.

ปราสาททอง พรหมเกิด ชมพูนุท จรรยาเพศ วัชรี สมสุข และวิไลวรรณ เวชยันต์. 2550. การศึกษาประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย 5 ชนิดกับหอยชัคซิเนียในห้องปฏิบัติการ.ในบทคัดย่อ การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8. อ. เมือง จ. พิษณุโลก. หน้า 20-21.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ**.** 2542. การใช้โปรโตซัว *Sar**cocystis singaporensis*** ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย**.** 43 หน้า**.**

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค และทรงทัพ แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่.รายงายผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยากรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ปิยาณี หนูกาฬ และทรงทัพ แก้วตา. 2541. การศึกษาโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในหนูพุกศัตรูพืช. รายงายผลการวิจัยปี 2541. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 102-103.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539**a**. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 255-256.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539**b**. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนอร์เวย์. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 257.

วิยะดา สีหบุตร. 2544. การศึกษาการใช้พยาธิจากหอยเดื่อในการป้องกันกำจัดหอยเชอรี่. เอกสารประกอบการ ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ **39** สาขาสัตว์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 5-7 กุมภาพันธ์ 2544 หน้า 11-17**.**

วิยะดา สีหบุตร. 2556. ตัวอ่อนของหนอนตัวกลมในหอยทากยักษ์ *Achatinafulica*Bowdich (1822)**.** วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2 (2), 98-107.

ศิริชัย ศรีหาตาชนิดาพร ตุ้มปี่สุวรรณ และศักดิ์บวร ตุ้มปี่สุวรรณ. 2553. ความหลากชนิด ความชุกชุม และถิ่นอาศัยของหอยทากบกในพื้นที่ 1 ตารางกิโลเมตรบนภูโน จังหวัดกาฬสินธุ์. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 29(4)**:** 359-371.

สุจินต์ แม้นเหมือน ประเทือง คลกิจ และภัทราวุธ จิวตระกูล. 2526**.** พืชคลุมคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม. วารสารยางพารา**.** 4(1):33-45.

สุทธาชีพ ศุภเกษร ไสว ลิ่มลิขิต และ สวาท ทองสุก.2533. ประโยชน์ของพืชคลุมคาโลโปโกเนียม ซีรูเลียม. กสิกร. 63(6)**:** 509-516.

โสมวรรณ สุขประเสริฐ และ อนุสรา ทองเอียม. 2009. ชนิดพันธุ์ต่างถิ่น **:** ขี้ไก่ย่าน *Mikania micrantha* (L.) Kunth**. [**ออนไลน์**]**. แหล่งข้อมูล **:** http://chm-thai.onep.go.th/chm/alien/forest_Mikania.html (21 ตุลาคม 2553)

Abbott, R.T. 1989. Compendium of land shell. Melbourne, Australia : AmericanMalacologist. 420 pp.

Andrassy L. 1983. A taxonomic Review of the sub-order Rhabditina (Nematoda: Secernentea). Office de alRechercheScientifiqueet Technique Outre-Mer, Paris.

Beaver, P.C. and J.R.Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* sp.p, and *Sarcocystis zamani* sp.n.: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. Journal of Parasitology. 67: 241-256.

Burch, J.B. 1962. How to Know the Eastern Land Snail. W.M.C. Brown CompanyPublisher, Dubuque Iowa, U.S.A. 214 pp.

Cheng T.C. and Alicata J.E. 1965.On the mode of infection of *Achatinafulica* by the larvae of *Angiostrongyluscantonensis.Malacologia* 2(2): 267-274.

Dawes, B. 1946. *The Trematoda*. Cambridge, UK: University Press.

DeLaCruz, D.2003. "Leucochloridiumparadoxum" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed February01,2012.

Dubey, J. P., C.A. Speer and R. Fayer. 1989. Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton, Florida: CRC Press. United States of America.

Dundee, D.S., and R.J. Baerwald. 1984. Observations an a micropredator, *GulellaBicolor* (Hutton) (Gastropoda: Pulmonata: Streptaxidae). *Nautilus* 98:63-68.

Edwin J. and Robinson, Jr.1947."Notes on the Life History of *Leucochloridiumfuscostriatum* n.sp. provis.(Trematoda: Brachylaemidae)".*The Journal of Parasitology* 34 (6): 467–475.

Elsheikha, H.M., A.J. Murphy and L.S. Mansfiled. 2004. Viability of *Sarcocystis neurona* sporocyst after long-term storage. Veterinary Parasitology. 123: 257-264.

Fayer, R. and T. Nerad. 1996. Effect of low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium pavum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology. 62: 1431-1433.

Gardiner, C.H., R. Fayer and J.P. Dubey. 1985. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Agriculture Handbook number **651**. United States Department of Agriculture.

Glen D.M., Wilson M.J., Brain P. and Stroud G. 2000. Feeding activity and survival of slug, *Derocerasreticulatum*, exposed to the rhabditid nematode, *Phasmarhabditishermaphrodita*: a model of dose response". *Biological Control*. 17 (1): 73–81.

Glen, D. M.,M.J.Wilson, L. Hughes, P. Cargeey and A. Hajijar. 1996. Exploring and exploiting the potential of the rhabditis nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita* as a bio-control snail pests jn agriculture. Monograph No. 66 British Crop Protection, Council, Famham .

Grewal P.S., Ehlers R.U. and Shapiro-Ilan D.I. 2005. Nematodes as Biocontrol Agents. CABI Publishing, UK. 524 pp.

Grewal P.S., Grewal S.K., Tan L. and Adams B.J. 2003. Parasitism of molluscs by nematodes: type of associations and evolutionary trends. *Journal of Nematology*. 35(2): 146-156.

Grewal S.K. and Grewal P.S. 2003. Survival of earthworm exposed to the slug-parasite nematode*Plasmarhabditishermaphrodita*. *Journal of Invertebrate Pathology*.82:72-74.

Grim B. 2002. Effect of the nematode *Phasmarhabditishermaphrodita* on young stage of the pest slug *Arion lusitanicus*. *J Molluscs Stud* 68:25-28.

Haefner, U and W. Frank. 1984. Host specificity and host range of the genus *Sarcocystis* in three snake-rodent life cycles. Zbl Bak Parasit Infec Hyg Orig. A 256, 296-299.

Hemmen J. and Hemmen C. 2001. Akktualisierteliste der terrestrischengastropodenThailands. Schr. Malakozool. 18:53-70.

Hemmen, J. and Hemmen C. 2001 Aktualisierte liste der terrestrischen gastropodenThailands. Schr. Malakozool. 18:35-70.

Hikosaka, K., N. Tsuji, Y. Watanabe, H. Kishine, T. Horii, I. Igarashi, K. Kita, K. Tanabe, N. Arisue, N.M. Palacpac, S. Kawazu and H. Sawai. 2010. Divergence of the

mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Molecular Biology. 27: 1107–1116.

Holm, L.G., D.L. Plucknett, J.V. Panchl and J.P. Herberger. 1977. The World's Worst Weeds. The univ. Press of Hawii, Hawaii. 609 p.

Jaekel, T., H. Burgstaller and W. Frank. 1996. *Sarcocystis singaporensis* : Studies on host specificity, pathogenicity, and potential use as a biocontrol agent of wild rats. Journal of Parasitology. 82: 280-287.

Lanini, W.T., D.W. Cudney, G. Miyao and K.J. Hembree. 2002. Dodder. Integrated Pest Management for Home Gardeners and Professional Horticulturalists. Pest Notes. University of California Agriculture and Natural Resources. Publication 7496. [Online]. Available. http://www.ipm.ucdavis.edu (June 4, 2010).

Levine, N.D. 1986. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa, Apicomplexa) species. Journal of Parasitology. 72: 372-382.

Macdicken.K.G., K. Hairaih, A. Otsamo, B. Duguma and M.N. Majid. 1997. Shade-based control of *Imperata cylindrica*: tree fallows and cover crops. Agroforestry systems 36(1-3) : 131-149.

Martens ,E.V. 1860. Die Preussische Expedition nach Ost-Asian. Zool. Theil. pp.66-68.

Morley N.J. and Morit D. 2006. The effect of the slug biological control agent, *Phasmarhabditishermaphrodita* (Nematoda) on non-target aquatic molluscs. *Journal of Invertebrate Pathology*. 92:112-114.

Naggs, F. 1989. *Gulella bicolor* (Hutton) and its implication for the taxonomy ofStreptaxidae. Journal of Conchology.33: 165-168.

Panha, S. 1996. A Checklist and Classification of the Terrestrial Pulmonate Snails of Thailand. Walkerana. 8 (19): pp. 11-64.

Pechova, H. and Foltan, P. 2008.The parasitic nematode *Phasmarhabditis hermaphrodita*defends its slug host from being predated or scavenged by manipulating host spatial behaviour. *Behavioural Processes*. 78 (3): 416–420.

Rennie, J. 1992. Trend in parasitology: Living together. *Scientific American*, January: 123-33.

Robbie Rae, Cyrille Verdun, Parwiner S Grewal, Jamie F Robertson and Michel J Wilson. 2007. Review Biological control of terrestrial mollusks using *Plasmarhabditishermaphrodita*progress and prospects. *Pest mamagement science*. 63:p1153-1164.

Schmidt G.D. and Roberts L.S. 2000. Foundation of parasitology. McGraw-Hill Comp.

Seehabut V. 2005. Nematodes in alimentary tracts of giant African snails (*Achatanafulica*) in Thailand. Kamphaengsaen Acad. J. 3(1): 37-41.

Solem, A. 1966. Some Non- Marine Mollusks from Thailand, with Notes on classification of the Helicarionidae. Spolia Zoologia Musei Hauniansis. pp.24 -114.

Tompa, A.S. 1984. Land Snails (Stylommatophora). In The Mollusca, Vol. 7: pp. 48-140.

Vaught, K. C. 1989. A classification of the living mollusca. American malacologists, Melbourne. 94 pp.

Wilson M.J., Glend D.M. and George S.K. 1993a. Therhabditis nematode *Plasmarhabditishermaphrodita* as a potential biological control agent for slug. *BiocontSciTechnol.* 3:503-511.

Wilson M.J., Glend D.M., George S.K. and Butler R.C. 1993b. Mass cultivation and storage of therhabditid nematode *Plasmarhabditishermaphrodita*, a biocontrol agent of slug.*BiocontSci Technol.* 3:513-521.

Wilson M.J., Hughes L.A., Hamacher G.M. and Glend D.M. 2000. Effect of *Plasmarhabditishermaphrodita*on non-target molluscs. *Pest Management Science.* 56:711-716.

Zhang, L.Y., Y. Wanhui, H. L.Cao and H. L. Feng. 2003. Mikania micrantha H.B.K. in China-an overview. European Weed Research Society Weed Research. Vol, 44, pp. 42-49.

เอกสารอ้างอิงกิจกรรมที่ 5

กรมวิชาการเกษตร. 2553. การจัดการเพลี้ยแป้งในมันสำปะหลัง. เอกสารวิชาการ. สำนักวิจัยพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 49 หน้า.

มานิตา คงชื่นสิน, วัฒนา จารณศรี, ฉัตรชัย ศฤงฆไพบูลย์, เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และพิเชฐ เชาว์วัฒนวงศ์. 2543. ชีววิทยาและประสิทธิภาพของไรตัวห้ำพันธุ์ต่างประเทศ *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot และ *Amblyseius californicus* (McGregor) และไรตัวห้ำพันธุ์พื้นเมือง, *Amblyseius longispinosus* (Evans). หน้า 29 – 30. *ใน*: เอกสารวิชาการ การประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่12. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร วันที่ 28-31 มีนาคม 2543 จังหวัดชลบุรี.

มานิตา คงชื่นสิน, อุษณีย์ ฉัตรตระกูล, สุริยนท์ รินบุตร และพลอยชมพู กรวิภาสเรือง. 2550. การผลิตขยายไรตัวห้ำเป็นปริมาณมาก. หน้า 211-220. *ใน*: เอกสารเผยแพร่ผลงานวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวง ประจำปี 2550.

รัตนา นชะพงษ์ และประภัสสร เชยคำแหง. 2554. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. หน้า 11- 30 *ใน*: เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตร “แมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด” ครั้งที่ 15, 25-29 กรกฎาคม 2554. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

รัตนา นชะพงษ์. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้แมลงห้ำ. หน้า 22 - 35 *ใน*: เอกสารประกอบการอบรม “แมลง-สัตว์ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด” ครั้งที่ 11, 19-30 มีนาคม 2544. กองกีฏและสัตววิทยา,กรมวิชาการเกษตร,กรุงเทพฯ.

รัตนา นชะพงษ์. 2551. มวนพิฆาต. *ใน*: เอกสารวิชาการเทคโนโลยีการใช้ชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช ทางการเกษตร. ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด: กรุงเทพฯ. หน้า 27 – 42

อัมพร วิโนทัย วัชริน แหลมคม ชลิดา อุณหวุฒิ ชมัยพร บัวมาศ และสมลักษณ์ จูทังคะ. 2553. นำเข้าแตนเบียน *Anagyrus lopezi* (De Santis) เพื่อควบคุมเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังโดยชีววิธี. หน้า 23-26. *ใน*: รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 15-17 มิถุนายน 2553 ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี.

อัมพร วิโนทัย. 2553. แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และโครงการพัฒนาขีดความสามารถการขยายพันธุ์แตนเบียน สถาบันพัฒนามันสำปะหลัง.

Kongchuensin, M., V. Charanasri and A. Takafuji. 2006. Suitable host plant and optimum initial ratios of predator and prey for mass-rearing the predatory mite, *Neoseiulus longispinosus* (Evans). Journal of the Acarological Society of Japan 15 (2): 145-150.

McMurtry, J. A. and B. A. Croft. 1997. Life-styles of phytoseiid mite and their roles in biological control. Annual Review of Entomology 42: 291-321.

ภาคผนวก

การคิดต้นทุน กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ประเภท งานผลิตพันธุ์ ชนิด แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

ต้นทุนการผลิตต่อ 1 คู่ (เพศผู้:เพศเมีย 1:1) ผลผลิต 75,000 คู่ ต่อปี

ขั้นตอนการดำเนินงาน	งบบุคคลากร						งบดำเนินการ			งบลงทุน	
	ข้าราชการ		พนักงานราชการ		จ้างเหมา		รายการ	รายละเอียด	งบประมาณ	รายการ	งบประมาณ
	จำนวน	งบประมาณ	จำนวน	งบประมาณ	จำนวน	งบประมาณ					
งบดำเนินการ							งบดำเนินการ				
1.เตรียมพ่อแม่พันธุ์แตนเบียน							1.ค่าตอบแทน				
2.เลี้ยงขยายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง						0.4	2.ค่าใช้สอย				
เลี้ยงด้วยฟักทอง							เบี้ยเลี้ยง ที่พัก ยานพาหนะ		0.16		
เลี้ยงด้วยมันสำปะหลัง							ค่าซ่อมแซมครุภัณฑ์		0.13		
3.เลี้ยงขยายแตนเบียน						0.4	3.ค่าวัสดุ				
เลี้ยงด้วยเพลี้ยแป้งบนผลฟักทอง							วัสดุสำหรับเลี้ยงเพลี้ยแป้ง	ฟักทอง, ท่อนมันสำปะหลัง	0.2		
เลี้ยงด้วยเพลี้ยแป้งบนต้นมันสำปะหลัง							วัสดุสำหรับการผลิต	พู่กัน แปรง น้ำผึ้ง สำลี	0.13		
4.เก็บผลผลิตแตนเบียนและบรรจุ						0.2	วัสดุสำหรับบรรจุแตนเบียน	ขวดพลาสติกเก็บแตนเบียน	0.07		
5.ทดสอบคุณภาพ							วัสดุอื่นๆ	ตะกร้า ถุงดำ ดิน ปุ๋ย กระถาง	0.11		
6.ล้างทำความสะอาด						0.2		อุปกรณ์ทำความสะอาด			
รวม						1.2			0.8		
							งบลงทุนทั้งสิ้น			2	

ค่าต้นทุนการผลิตต่อ 1 คู่ (เพศผู้:เพศเมีย 1:1) ไม่รวมงบบุคลากร (ข้าราชการและพนักงานราชการ) และสาธารณูปโภค